



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

MATTI MURTO
SOLUMITTAUKSIIN SOVELTUVIEN FLUORESOIVIEN KEMOSEN-
SORIEN KARAKTERISOINTI

Diplomityö

Tarkastajat: yliopistonlehtori Elina
Vuorimaa-Laukkanen ja Associate
Professor Timo Laaksonen.
Tarkastajat ja aihe hyväksytty
28. helmikuuta 2018

TIIVISTELMÄ

MATTI MURTO: Solumittauksiin soveltuvien fluoresoivien kemosensoirien karakterisointi

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 44 sivua, 2 liitesivua

Marraskuu 2018

Teknis-luonnontieteellinen diplomi-insinöörin tutkinto-ohjelma

Pääaine: Kemia

Tarkastajat: yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen ja Associate Professor Timo Laaksonen

Avainsanat: fluoresenssi, fluoresenssin sammuminen, fluoresoivat merkkiaineet, pH-mittaukset, aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta

Tämä diplomityö tehtiin Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laitokselle. Työssä tarkasteltiin neljän fluoresoivan merkkiaineen fluoresenssin elinajan ja intensiteetin muuttumista muuttaessa tutkimusolosuhteita. Sen tarkoituksena oli saada tietoa kyseisten merkkiaineiden käyttökelpoisuudesta laitoksen tutkimusprojekteissa, joissa tutkitaan lääkeaineiden kuljetusta soluihin ja solunsisäisten olosuhteiden muutoksia.

Aluksi tutkittiin kahden eri fluoresoivan merkkiaineen, BCECF:n ja LysoSensor Bluen, käyttöä pH-indikaattoreina. Tämän lisäksi tutkittiin Fluo-3:n käyttöä kalsiumindikaattorina, ja lusigeniinin käyttöä kloridi-indikaattorina. Merkkiaineista valmistettiin spektromittauksia varten näyteliuokset joko fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen tai ultra-puhtaaseen veteen. Niistä mitattiin absorptiospektrit ja fluoresenssin eksitaatio- ja emissiospektrit, sekä fluoresenssin elinajat käyttäen aikaerotteista yksittäisfotonilaskentaa (TCSPC).

BCECF:n ja lusigeniinin elinaikojen todettiin muuttuvan selkeästi olosuhteiden myötä. Täten BCECF soveltuu hyvin pH-määrittäykseen sekä lusigeniini kloridikonsentraation määrittämiseen elinaikamittauksien avulla. Sen sijaan LysoSensor Blue ja Fluo-3 osoittautuivat sopimattomiksi elinaikamittauksiin, koska niiden elinajoissa joko ei tapahtunut havaittavia muutoksia, tai ne olivat satunnaisia. Kaikki merkkiaineet soveltuivat kuitenkin käytettäväksi stationäärisissä mittauksissa, kuten fluoresenssimikroskopiassa, normaaleissa solunsisäisissä olosuhteissa.

ABSTRACT

MATTI MURTO: Characterization of fluorescent chemosensors suitable for cellular measurements

Tampere University of Technology

Master of Science Thesis, 44 pages, 2 Appendix pages

November 2018

Master's Degree Programme in Science and Engineering

Major: Chemistry

Examiner: University lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen and Associate Professor Timo Laaksonen

Keywords: fluorescence, fluorescence quenching, fluorescent probes, pH measurements, time correlated single photon counting

This master's thesis was carried out at the Laboratory of Chemistry and Bioengineering, Tampere University of Technology. The objective was to study the changes in fluorescence lifetime and intensity of four different fluorescent probes. The purpose of the thesis study was to gain information about the usefulness of these fluorescent probes for the research on drug carriers, and studies of intracellular changes in the chemical microenvironment.

The first stage was to study the suitability of two fluorescent probes, BCECF and LysoSensor Blue, as pH indicators. This was followed with studies of Fluo-3 as a calcium indicator, and of lucigenin as a chloride indicator. For spectroscopic studies, samples were made from all the probes, using either phosphate-buffered saline or ultrapure water. The absorption and fluorescence excitation and emission spectra were measured from all the samples. The fluorescence lifetimes of the samples were also measured using time correlated single photon counting (TCSPC).

The lifetimes of BCECF and lucigenin were found to change significantly with the changes in their environment, making BCECF well suited as pH indicator, and lucigenin as chloride indicator, when using lifetime measurements. As the lifetime changes of LysoSensor Blue and Fluo-3 were either too small to measure or did not take place, these probes turned out to be unsuitable for TCSPC. However, all four fluorescent probes were found to be suitable for steady state measurements, for example using fluorescence microscopy, under typical intracellular conditions.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laitokselle. Haluan kiittää työni tarkastajia, Elina Vuorimaa-Laukkasta ja Timo Laaksosta, paitsi saamastani ohjauksesta ja avusta, myös tilaisuudesta tehdä tämä diplomityö. Lisäksi esitän kiitokset Ekaterina Lisitsynalle ja Kaisa Rautaniemelle avusta mittausten ja kirjoittamisen kanssa.

Kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni kärsivällisyydestä ja tuesta, jonka avulla tämä työ on lopulta syntynyt.

Tampereella, 19.11.2018

Matti Murto

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO.....	1
2.	FLUORESENSSI.....	2
2.1	Fluoresenssin teoriaa	2
2.1.1	Viritystilat ja niiden purkautuminen	2
2.1.2	Fluoresenssispektri	4
2.1.3	Fluoresenssin elinaika	5
2.1.4	Fluoresenssin kvanttisuhde	7
2.2	Fluoresenssiin vaikuttavat tekijät	8
2.2.1	Fluoroforit pH-indikaattoreina	8
2.3	Fluoresenssin sammuminen	11
2.3.1	Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (FRET)	11
2.3.2	Dynaaminen sammuminen	13
2.3.3	Staattinen sammuminen	14
2.4	Fluoresoivat merkkiaineet	16
2.4.1	Fluoreseiinijohdannaiset (BCECF ja Fluo-3).....	17
2.4.2	LysoSensor-merkkiaineet	19
2.4.3	Lusigeniini.....	20
3.	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	22
3.1	Materiaalit	22
3.1.1	BCECF	23
3.1.2	LysoSensor Blue DND-167	24
3.1.3	Fluo-3	24
3.1.4	Lusigeniini.....	24
3.2	Spektroskooppiset menetelmät.....	25
3.2.1	Fluoresenssi- ja eksitaatiospektrit	25
3.2.2	Absorptiospektrofotometria	26
3.2.3	Aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta	26
4.	TULOKSET	28
4.1	Fluoresenssin riippuvuus pH:sta	28
4.1.1	BCECF	28
4.1.2	LysoSensor Blue	31
4.2	Fluoresenssin riippuvuus kalsiumionien konsentraatiosta	34
4.3	Fluoresenssin riippuvuus kloridi-ionien konsentraatiosta.....	36
5.	YHTEENVETO	40
	LÄHTEET	42
	LIITE A: Fluoresenssin elinaikamittausten tulokset.....	45

LYHENTEET JA MERKINNÄT

BCECF	2',7'-Bis-(2-karboksietyyli)-5-(ja-6)-karboksifluoreseiini
DMSO	dimetyylisulfoksidi, C_2H_6OS
FLIM	elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia (engl. Fluorescence-life-time imaging microscopy)
FRET	fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (engl. fluorescence resonance energy transfer), myös Försterin resonanssi-energiansiirto
FWHM	puoliarvoleveys (engl. Full Width at Half Maximum)
IC	sisäsiirtymä (engl. Internal crossing)
ISC	systemien välinen siirtymä (engl. Intersystem crossing)
IRF	instrumenttifunktio (engl. Instrumental response function)
NAD+	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi; pelkistynyt muoto on NADH.
NADP+	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti; pelkistynyt muoto on NADPH.
PBS	fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos (engl. Phosphate buffered saline)
S	singlettitila
T	triplettitila
TCSPC	aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta (engl. Time correlated single photon counting)
VR	vibraatiorelaksaatio
a	fluoresenssin elinajan amplitudi
c	[1] konsentraatio (mol/l) [2] valonnopeus; $2,998 \times 10^8$ m/s
h	Planckin vakio; $6,626 \times 10^{-34}$ Js
k	nopeusvakio
λ	aallonpituus (m), ilmoitetaan yleensä nanometreinä
M	molaarisuus; 1 M on 1 mol/l
m	massa (kg)
ν	fotonin taajuus (1/s)
Q	kvanttisuhde
$[Q]$	sammuttajan konsentraatio (mol/l)
R_0	Försterin etäisyys (m), ilmoitetaan yleensä ångströmeinä
τ	fluoresenssin elinaika (s), ilmoitetaan yleensä nanosekunteina

1. JOHDANTO

Lääketieteessä, biologiassa ja näitä sivuavissa kemian osa-alueissa on usein tarpeen tarkastella elävien solujen toimintaa ja niiden kemiallisen ja fysikaalisen ympäristön muutoksia. Eräs hyväksi havaittu ja monipuolisia mittaushdollisuuksia tarjoava keino tähän on fluoresoivien väriaineiden käyttö. Tällä keinolla voidaan saada solut ja niiden osat näkymään paremmin mikroskoopissa, korostaa tutkittavia soluelimiä, seurata lääkeaineiden kulkeutumista soluihin, ja saada monenlaista tietoa solujen aineenvaihdunnasta ja niiden mikroympäristön olosuhteista.

Fluoresenssilla tarkoitetaan valon emissiota elektronisesti virittyneistä molekyyleistä. Kun fluoresoiva molekyyli absorboi valoa, sen elektronit virittyvät eli siirtyvät korkeampaan energiatilaan. Tämän viritystilan purkautuessa syntyy valoa, eli aine fluoresoi. Fluoresenssin intensiteetti ja elin aika, eli aika joka kuluu molekyylin virittymisestä fotonin emittoimiseen, riippuvat fluoresoivan molekyylin ympäristön fysikaalisista olosuhteista kuten happamuudesta, paineesta, lämpötilasta ym., sekä ympäristön kemiallisista oloista.

Tässä diplomityössä tarkasteltiin neljää eri fluoresoivaa merkkiainetta, ja tutkittiin niiden fluoresenssin intensiteetin ja elinajan muutoksia ympäristön olosuhteiden muuttuessa. Merkkiaineista kaksi, BCECF ja LysoSensor Blue, olivat pH-indikaattoreiksi sopivia, kun taas toiset kaksi, Fluo-3 ja lusigeniini, oli valittu siten, että ne olivat herkkiä solun toiminnan kannalta tärkeiden ionien, kalsiumkationin ja kloridianionin, konsentraatioiden muutoksille.

Teoriaosassa käydään aluksi lyhyesti läpi fluoresenssin teoriaa, fluoresenssiin vaikuttavia ulkoisia tekijöitä ja fluoresenssin sammumisen mekanisme. Tämän jälkeen esitellään työssä käytetyt fluoresoivat merkkiaineet sekä eräitä muita samankaltaisia merkkiaineita, ja esitetään joitain esimerkkejä niiden käytöstä luonnontieteissä.

Menetelmäosassa esitetään näytteiden valmistus ja esitellään työssä käytetyt spektrimitausmenetelmät – spektrofotometria, absorptiospektrofotometria ja aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta (TCSPC) – sekä spektrimittausten parametrit. Lopuksi kokeellisessa osassa tutkitaan kaikkien neljän merkkiaineen absorptiospektrejä, fluoresenssin intensiteetin muutoksia, ja elinajan muutoksia TCSPC:tä käyttäen.

2. FLUORESENSSI

2.1 Fluoresenssin teoriaa

Valokemia eli fotokemia on kemian osa-alue, joka käsittelee sähkömagneettisen säteilyn aikaansaamia kemiallisia reaktioita ja muita ilmiöitä. Valokemialliset ilmiöt perustuvat säteilyn absorptioon, missä molekyylin säteilyä absorboiva osa eli kromofori (Tkachenko 2006, s. 4) ottaa vastaan fotonin energian, joka määritellään seuraavasti:

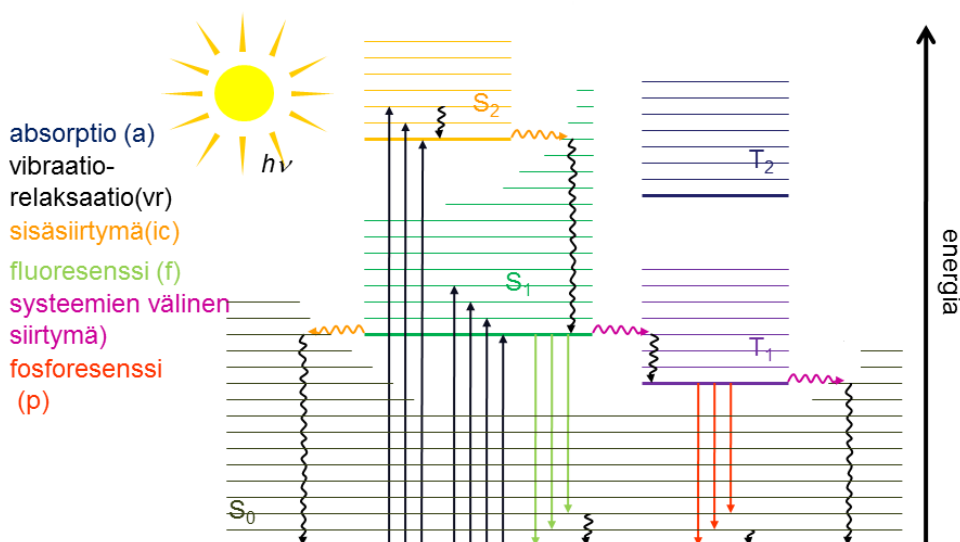
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad 2.1$$

Tässä h on Planckin vakio ($6,626 \times 10^{-34}$ J s), ν fotonin taajuus (1/s), c valon nopeus ($2,998 \times 10^8$ m/s) ja λ säteilyn aallonpituus (m).

Tällöin vähintään yksi molekyylin elektroni siirtyy alemmalta korkeammalle energiatilalle, eli molekyyli virittyy. Virittyminen voi tapahtua, jos fotonin energia on yhtä suuri kuin kahden energiatilan välinen erotus. Viritystila voi purkautua eri tavoilla, joista tämän työn kannalta merkittävien on fluoresenssi.

2.1.1 Viritystilat ja niiden purkautuminen

Kuvassa 1. on esitetty virittymistiloja kuvaava Jablonskin diagrammi. Siinä tunnuksella S merkityt singlettitilat tarkoittavat energiatiloja, joissa kokonaisspin $S=0$, ja spinin kerrannaisuus (engl. *multiplicity*) on $2S+1=1$. S_0 merkitsee perustilaista singlettiä, S_1 ensimmäistä virittynyttä singletttilaa jne. Suurempi alaindeksi tarkoittaa siis aina korkeampaa virittynyttä tilaa ja suurempaa tilan energiaa. Vastaavasti triplettilassa elektroneilla on samansuuntaiset spinit, jolloin kokonaisspin $S=1$, ja kerrannaisuus $2S+1=3$. (Valeur 2001, s. 21-22) Triplettiloja merkitään vastaavasti T_1, T_2 jne. ja ne vastaavat virittyneitä singlettitiloja, tosin hieman matalammilla energioilla: $E(T_i) < E(S_i)$ (Kalliorinne *et al.*, 1990).



Kuva 1. Jablonskin diagrammi. Singlettitilat on merkitty S -kirjaimella ja triplettitilat T -kirjaimella. Suorat viivat vastaavat säteileviä siirtymiä ja aaltoviivat säteilemättömiä.

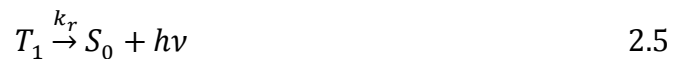
Elektronien viritystilojen väliset energiaerot vastaavat fotonien energioita ultraviolettialueella (100 – 400 nm) ja näkyvän valon alueella (400 – 700 nm). Elektronien viritymisenergian lisäksi molekyyliellä on kineettistä energiaa vibraatio- ja rotaatioenergian muodossa. Vibraatiotilojen väliset siirtymät vastaavat infrapunasäteilyn (700 nm – 1 mm) energioita, ja rotaatiotilojen väliset siirtymät mikroaaltosäteilyn (1 mm – 1 m) energioita. (Engel & Reid 2010, s. 414) Elektronien viritystilojen energiaerot ovat huomattavasti suurempia kuin vibraatiotilojen väliset energiaerot, jotka puolestaan ovat huomattavasti suurempia kuin rotaatiotilojen väliset. Valokemiassa keskitytäänkin yleensä vain spektrin alueelle lähi-ultraviolettista näkyvän valon kautta lähi-infrapunaan (100 – 1000 nm), missä vain elektronien viritystilojen ja vibraatiotilojen energiat ovat merkittäviä.

Molekyylin virittyessä se voi siirtyä perustilalta eri elektronisille viritystiloille. Näiden purkautuminen voi tapahtua joko säteilevinä tai säteilemättöminä siirtyminä. Säteilevissä siirtymissä molekyyli luopuu energiasta fotonin muodossa, kun taas säteilemättömissä siirtymissä energia vapautuu lämpönä. S_1 -tilaa korkeammat elektronien viritystilat relaksoituvat S_1 -tilalle säteilemättömillä sisäsiirtymillä (engl. internal conversion, IC). Tämä on siirtymä kahden kokonaisenergialtaan yhtä suuren vibraatiotilan välillä. Sisäsiirtymissä kerrannaisuus säilyy. (Valeur 2001, s. 41) Korkeammat vibraatiotilat purkautuvat esim. molekyylien välisissä törmäyksissä lämpönä ympäristöön. Tämä on vibraatiorelaksaatio, ja sen jälkeen vain alin vibraatiotila on merkittävästi miehittynyt. (Valeur 2001, s. 37) Sekä sisäsiirtymä että vibraatiorelaksaatio ovat hyvin nopeita siirtymiä; sisäsiirtymään eri viritystilojen välillä kuluu yleensä $10^{-14} - 10^{-11}$ s, ja vibraatiorelaksaatioon $10^{-13} - 10^{-9}$ s.

Ensimmäinen virittynyt singlettitila voi purkautua kolmella eri tavalla:



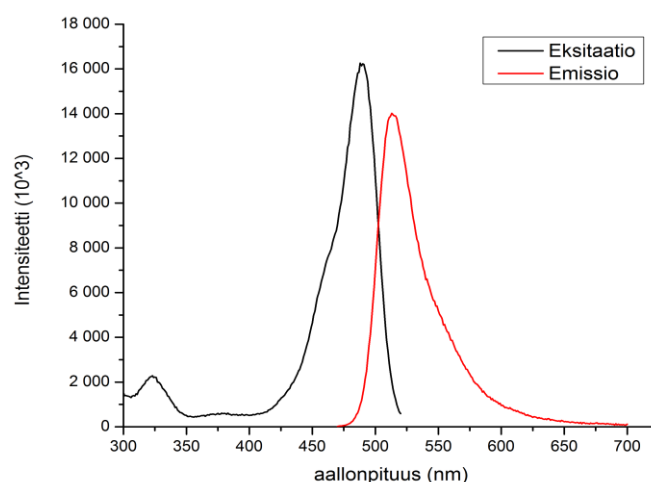
Tässä k_f on säteilevän siirtymän nopeusvakio, k_{ic} on sisäsiirtymän nopeusvakio, ja k_{isc} on systeemien välisen siirtymän (engl. intersystem crossing, ISC) nopeusvakio. Näistä yhtälö 2.2., kuvaa fluoresenssia, joka on säteilevä siirtymä, missä molekyyli luovuttaa ylimääräisen energian emittoimalla fotonin. Yhtälö 2.3. kuvaa sisäsiirtymää, ja yhtälö 2.4. systeemien välistä siirtymää singlettitalta vastaavalle triplettilalle. Systeemien välisessä siirtymässä kerrannaisuus ei säily, minkä kvanttimekaniikan valintasäännöt periaatteessa kieltävät. Valintasäännöt ovat kuitenkin vain approksimaatioita, ja siirtymä on mahdollinen spin-rata-kytkennän ansiosta. (Valeur 2001, s. 41) Siirtymän todennäköisyys on silti huomattavasti pienempi ja siihen kuluva aika näin ollen pitempi kuin kahteen muuhun purkautumiseen. ISC:ssä syntynyt T_1 -tila on myös virittynyt ja voi purkautua kahta eri reittiä, joko säteilevän siirtymän tai sisäsiirtymän kautta (Valeur 2001, s.41):



Näistä yhtälön 2.5 kuvaamaa ilmiötä kutsutaan fosforenssiksi. Se on huomattavasti hitaampi prosessi kuin fluoresenssi; tyypillisesti fosforenssin relaksaatioaika on 10^{-3} – 10^{-2} s kun fluoresenssille se on 10^{-12} – 10^{-6} s. (Kalliorinne ym. 1990, s. 168) Hitautensa takia fosforenssia esiintyy yleensä kiinteissä aineissa ja matalissa lämpötiloissa, missä muut viritystilan purkavat prosessit eivät ole hallitsevia. (Valeur 2001, s. 41)

2.1.2 Fluoresenssispektri

Fluoresoivan aineen absorptiospektri ja eksitaatiospektri ovat ihannetapauksessa identtiset, mikäli perustilassa on vain yhtä molekyyliä. (Valeur 2001, s. 52-53) Emissiospektri puolestaan on yleensä muodoltaan eksitaatiospektrin peilikuva, mikä johtuu siitä, että samat elektronin energiatasot ja vibraatiotasot ovat kyseessä sekä absorptiossa, että emissiossa. Useimpien fluoroforien energiatasot S_0 ja S_1 eivät juuri muutu elektronien jakauman muuttuessa. (Lakowicz 2006, s. 5) Kuvassa 2. nähdään fluoreseinin emissio- ja eksitaatiospektrit ja niiden muotojen peilikuvanomaisuus.



Kuva 2. Eksitaatio- ja emissiospektrit fluoreseiinille KH_2PO_4 -puskuriliuoksessa pH 7,6:ssa. Fluoreseiinin konsentraatio näytteessä 4,2 $\mu\text{mol/l}$.

Emittoituvan fotonin energia on yleisesti pienempi kuin virittäneen fotonin, joten fluoresenssin aallonpituudet ovat korkeampia kuin absorptio. Myös S0- ja S1-tilojen alimpien vibraatiotasojen välinen siirtymä on fluoresenssispektrissä pidemmällä aallonpituudella kuin eksitaatiospektrissä. Tätä kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Siirtymä tapahtuu, koska molekyylinen polaarisuus on pienempi perustilassa kuin virittyneessä tilassa. Liuttimolekyylit järjestäytyvät uudestaan virittyneen molekyylin ympärille pienentäen tilan energiaa. Fluoresoivat aineet kokemaan Stokesin siirtymään vaikuttavat käytetty liuotin (solvatokromismi), viritystilän reaktiot, mahdollisten kompleksien muodostuminen, sekä mahdollinen energiansiirto. (Lakowicz 2006, s. 5-6) Kuvassa 2. nähdään fluoreseiinin emissiospektrin siirtyminen pitemmille aallonpituuksille sen eksitaatiospektriin verrattuna.

Eräs fluoresenssin yleinen ominaisuus on se, että fluoresenssin emissiospektrin muoto ei yleensä muutu virittävän valon aallonpituuden mukaan. Tämä tunnetaan Kashan sääntönä. Kun molekyyli virittyy ja siirtyy korkeammille energia- ja vibraatiotasolle, ylimääräinen energia hajaantuu nopeasti, jolloin molekyyli jää S1-tason alhaisimmalle viritystasolle. Tämän nopean ($\sim 10^{-12}$ s) vibraatiorelaksaation vuoksi emissiospektrit eivät yleensä ole riippuvaisia käytetystä viritysaallonpituudesta. (Lakowicz 2006, s. 6)

2.1.3 Fluoresenssin elinaika

Tässä työssä on haluttu ensisijaisesti tutkia valittujen aineiden fluoresenssin elinaikaa. Sillä tarkoitetaan aikaa, jonka molekyyli on keskimäärin virittyneenä, ennen kuin se vapauttaa ylimääräisen energian fotonina. S1-tilan purkautumisnopeus riippuu säteilevien ja säteilemättömien siirtymien nopeusvakioista rinnakkaisena ensimmäisen kertaluvun reaktiona.

Tämä voidaan esittää seuraavasti (Valeur 2001, s. 42-44):

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -k_r[S_1] - k_{ic}[S_1] - k_{isc}[S_1] \quad 2.7$$

Tässä t on aika (s) ja $[S_1]$ on S_1 -tilan konsentraatio. Fluoresenssin elinaika τ (s) on kääntäen verrannollinen fluoresenssin ja säteilemättömien siirtymien nopeusvakioiden summaan:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{ic} + k_{isc}} \quad 2.8$$

Yhtälöt 2.7 ja 2.8 voidaan yhdistää:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -\frac{[S_1]}{\tau} \quad 2.9$$

Kun erotetaan muuttujat ja integroidaan puolittain, saadaan S_1 -konsentraatiolle seuraava yhtälö ajan funktiona:

$$[S_1] = [S_1]_0 e^{-t/\tau} \quad 2.10$$

Käytännön sovelluksissa fluoresenssin elinaika havaitaan fluoresenssin intensiteetin I (W/m^2) vaimenemisena ajan suhteen. Mikäli kyse on homogeenisesta ja laimeasta liuoksesta, fluoresenssilla on vain yksi elinaika. Monimutkaisemmissa tapauksissa niitä on kuitenkin useampia. Jos fluoresoivalla aineella on N elinaikaa, joista kunkin amplitudi eli elinajan määrä vaimenemiskuvaajassa on a_i , on fluoresenssin intensiteetti ajan suhteen:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-t/\tau_i} \quad 2.11$$

Amplitudin sijaan käytetään usein elinajan osuutta f_i , joka on helpommin vertailtavissa. Se on määritelty seuraavasti (Lakowicz 2006, s. 158):

$$f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_{j=1}^N a_j \tau_j} \quad 2.12$$

Elinajojen osuuksien summa on yksi. (Valeur 2001, s. 171-173) Ne voidaan esittää myös suhteellisina osuuksina prosenttilukuina. Fluoresenssin elinaika voidaan määrittää laskennallisesti sovittamalla yhtälö 2.11 kokeellisesti saatuun vaimenemiskuvaajaan.

Jos fluoresenssin aikariippuvuus on moniekspontiaalista, elinajan kuvaamisessa käytetään usein keskimääräistä elinaikaa τ_{av} , joka voidaan määritellä eri tavoin. (Valeur 2001, s. 171-173) Tässä yhteydessä käsitetään keskimääräinen elinaika keskimääräiseksi ajaksi

virityspulssin ja emittoitujen fotonien detektorille saapumisen välissä. Mitä useampia fluoresenssin elinaikoja ilmenee, sen vaikeampaa fluoresenssin elinaikojen ja amplituidien määrittäminen yksiselitteisesti on. (Lakowicz 2006, s. 103)

Vaikka fluoresenssin laskennallinen vaimenemiskuvaaja olisi kaksi- tai useampieksponenttinen, tämä ei välttämättä tarkoita, että fluoresenssilla olisi kaksi todellista elinaikaa. Erilaiset vuorovaikutukset, kuten ei-fluoresoivien kompleksien muodostuminen ja energiansiirrot molekyylien välillä, voivat tehdä kuvaajasta ei-eksponentiaalisen. Tällöin siihen voidaan yleensä tehdä monieksponentiaalinen sovitus elinajan määrittämiseksi, mutta kaikki parametrit eivät ole välttämättä fysikaalisesti selitettävissä. (Lakowicz 2006, s. 158)

2.1.4 Fluoresenssin kvanttisuhde

Toinen fluoresenssin oleellinen ominaisuus on kvanttisuhde (engl. quantum yield, Q), millä tarkoitetaan emittoitujen fotonien lukumäärän suhdetta absorboitujen fotonien lukumäärään. Mitä suurempi aineen kvanttisuhde on, sitä kirkkaammin se emittoi valoa. Tässä tärkeimmät termit ovat fluoroфорin emissionopeusvakio (k_f) ja säteilemättömän vaimenemisen nopeusvakio (k_{nr}), joka kuvaa kaikkien ei-säteilevien vaimenemisprosessien nopeutta. (Lakowicz 2006, s. 9)

Kvanttisuhde voidaan laskea seuraavasti:

$$Q = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad 2.13$$

Stokesin siirtymässä tapahtuvien energiahäviöiden takia kvanttisuhde jää aina alle yhteen. Se voi olla lähellä yhtä, mikäli säteilemättömän vaimenemisen nopeusvakio on huomattavasti pienempi kuin säteilevän vaimenemisen, eli $k_{nr} < \Gamma$. (Lakowicz 2006, s. 9)

2.2 Fluoresenssiin vaikuttavat tekijät

Aiemmin lueteltujen viritystilan purkautumisreittien, eli fluoresenssin, sisäsiirtymän ja systeemien välisen siirtymän ja sitä seuraavan fosforenssin, lisäksi virittynyt molekyyli voi palautua perustilaan myös muista syistä. Molekyylin sisällä voi tapahtua varauksen-siirto tai sen konformaatio muuttua, palauttaen molekyylin perustilaansa. Tämän lisäksi on erilaisia molekyylien välisiä vuorovaikutuksia jotka voivat johtaa virittymisen purkau-tumiseen. Näitä ovat elektronin- ja protoninsiirto, energiansiirto, ja eksimeerin tai ek-sipleksin muodostuminen. (Valeur 2001, s. 9-10) Nämä vaihtoehtoiset reitit ovat mahdol-lisia, jos ne tapahtuvat suunnilleen samassa aikaskaalassa kuin fluoresenssi.

Molekyylin mikroympäristön olosuhteet vaikuttavat fluoresenssiin, muuttaen fluoresens-sispektrin muotoa, fluoresenssin kvantisuhdetta ja elinaikaa. Tähän perustuu fluoresens-sin käyttö erilaisten fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien, kuten poolisuuden, pH:n, paineen, viskositeetin, lämpötilan, vetysidosten ja fluoresenssin sammuttajien läs-näolon tutkimiseen. (Valeur 2001, s. 10-11) Tässä työssä on keskitytty pH:n ja kahden eri ionin, Ca^{2+} ja Cl^- , tutkimiseen.

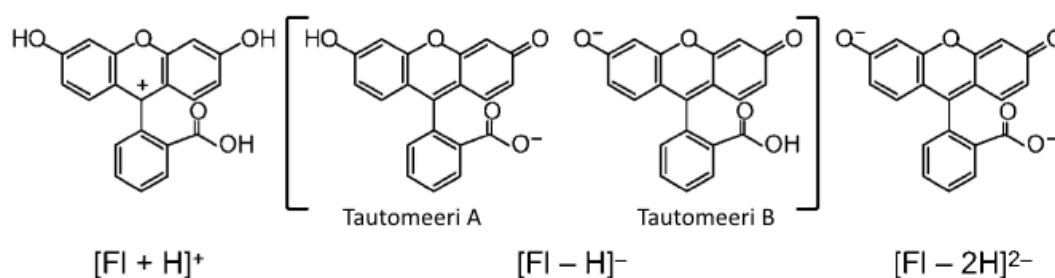
2.2.1 Fluoroforit pH-indikaattoreina

Eukaryoottien soluissa pH vaihtelee eri osien välillä. Esimerkiksi soluun endosytoosin kautta tulevat biomolekyylit prosessoidaan soluelimissä siten, että prosessin edetessä so-luelinten pH laskee. Lisäksi osa soluelimistä, kuten lysosomit ja kasvisolujen vakuolit eli solurakkulat, ovat luonnostaan happamia. (Johnson & Spence 2010, s. 894) Happamuu-den muutokset sytosolissa eli solulimassa ja soluelimissä voivat myös kertoa solun toi-minnan häiriöistä ja sairauksista.

Fluoresoivilla pH-indikaattoreilla on monia etuja solunsisäisen pH:n määrittämisessä ver-rattuna vaihtoehtoisiin menetelmiin, kuten mikroelektrodeihin tai NMR- ja absorptio-spektroskopiaan. pH:n optinen määrittäminen fluoresenssin avulla on hyvin tarkkaa, hel-posti toteutettavissa, ja soveltuu elävien solujen tutkimiseen. (Han & Burgess 2010, s. 2709)

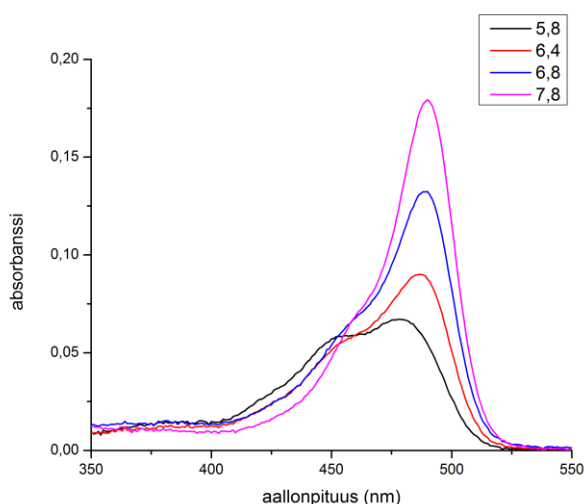
Kvantitatiivisissa mittauksissa on tärkeää valita indikaattori, jonka pK_a vastaa tutkittavan ympäristön pH:ta. Solunsisäinen pH on yleensä välillä $\sim 6,8 - 7,4$ sytosolissa, ja $\sim 4,5 - 6,0$ happamissa soluelimissä. Toisin kuin kudosten elektrolyyttipitoisuudet, jotka voivat vaihdella lyhyessä ajassa jopa satakertaisesti, solun sisäinen pH muuttuu hitaasti ja vain muutamia pH-yksikön murto-osia. (Johnson & Spence 2019, s. 885)

Fluoresoivien pH-indikaattorien toiminta perustuu siihen, että niillä on erilaiset protonoitumisasteet riippuen ympäristön pH:sta, ja nämä eri muodot fluoresoivat eri tavoin. Tyyppillinen esimerkki on fluoreseiini, joka voi toimia indikaattorina välillä pH 1 – 8. Vesiliuoksessa sillä on pH:sta riippuen jopa seitsemän eri rakennemuotoa, joista kolme on neutraaleja ja neljä varauksellisia. (Sjöback *et al.* 1995) Kuvassa 3. on esitetty fluoreseiinin varaukselliset muodot.



Kuva 3. Fluoreseiinin kationinen muoto $[Fl + H]^+$, monoanioniset muodot $[Fl - H]^-$ ja dianioninen muoto $[Fl - 2H]^{2-}$ [Muokattu lähteestä McQueen *et al.* 2010]

Fluoreseiinin absorbanssi ja kvanttisuhde riippuvat voimakkaasti protonoitumisasteesta. Dianioni $[Fl - 2H]^{2-}$ sekä absorboi että fluoresoi vesiliuoksessa voimakkaimmin ($Q = 0,92$). Monoanioni $[Fl - H]^-$ fluoresoi myös, mutta sen absorbanssi ja fluoresenssin kvanttisuhde ovat matalampia ($Q = 0,37$). Kationinen fluoreseiini, sekä neutraalit muodot, fluoresoivat heikosti (efektiivinen $Q = 0,18$) ja senkin uskotaan johtuvan virittyneen tilan deprotonoitumisesta, joka tuottaa virittyneen, fluoresoivan monoanionin. (McQueen *et al.* 2010, s. 9193)



Kuva 4. Fluoreseiinin absorbanssi pH-välillä 5,8 – 7,8. Näyte oli valmistettu K_2HPO_4 -puskuriliuoksessa. Fluoreseiinin konsentraatio oli 0,45 mmol/l.

Kuvassa 4. esitetään fluoreseiinin absorptiospektri neljällä pH-arvolla välillä 5,8 – 7,8. Siinä näkyy hyvin absorptiospektrin muodon muuttuminen ja kokonaisintensiteetin nousu pH:n kasvaessa, mikä johtuu fluoreseiinin deprotonoitumisesta ja dianionisen fluoreseiinin osuuden kasvusta muiden varattujen muotojen sekä neutraalien muotojen kustannuksella.

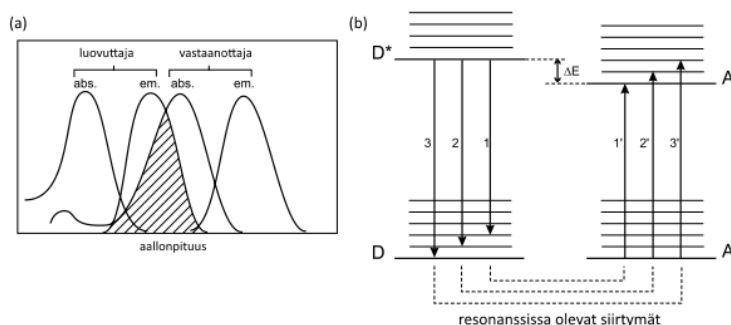
2.3 Fluoresenssin sammuminen

Fluoresenssin sammuminen voidaan määritellä bimolekulaariseksi prosessiksi, jossa fluoresenssin kvantisuhde pienenee mutta emissiospektrin muoto ei muutu. Fluoroforin viritystila voi purkautua sen joutuessa kontaktiin toisen luoksessa olevan molekyylin eli sammuttajan kanssa. Tällöin fluorofori palaa perustilaan ilman kemiallisia muutoksia. Näitä sammuttavia molekyyliä ovat esimerkiksi molekulaarinen happi, halogeenit (varsinkin raskaammat halogeenit kuten jodi), amiinit ja niukasti elektroneja sisältävät molekyylit kuten akryyliamidi. (Lakowicz 2006, s. 11) Suurilla konsentraatioilla voi tapahtua itsesammutusta, eli fluorofori voi toimia omana sammuttajanaan. (Johnson & Spence 2010, s. 7)

2.3.1 Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (FRET)

Virittynyt molekyyli voi siirtää energiansa toiselle molekyylille, mikäli ne ovat riittävän lähellä toisiaan ($\sim 30 - 60 \text{ \AA}$). Tätä säteilemättömän energiansiirron muotoa kutsutaan fluoresenssi- (tai Förster-) resonanssi-energiansiirroksi eli FRET:ksi. Sitä käytetään usein molekyylien vuorovaikutuksen seuraamiseen ja kuvantamiseen, koska monet biologiset prosessit kuten proteiinien vuorovaikutukset tapahtuvat samaa luokkaa olevilla etäisyyksillä. (Lakowicz, 2006, s. 13)

Tämä säteilemätön siirtymä voi tapahtua, jos energiaa luovuttavan molekyylin (donorin) emissiospektri osuu osittain päällekkäin vastaanottavan molekyylin (akseptorin) absorptiospektrin kanssa, kuten kuvassa 5 a. Tällöin donorin ja akseptorin vibraatiotilojen väliset energiat ovat käytännössä samat, eli niitä vastaavat siirtymät ovat resonanssissa. (Kuva 5 b.) Energiansiirto tapahtuu, mikäli molekyylien välillä on polaarisuudesta johtuvia coulombisia vuorovaikutuksia, tai jos molekyylien orbitaalit ovat osittain päällekkäiset. (Valeur 2001, s. 113)



Kuva 5. Luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylien emissio- ja absorptiospektrien päällekkäisyys (a) ja kaavio resonanssissa olevien vibraatioenergiatasojen suhteista ja niiden välisistä siirtymistä (b). [Muokattu lähteestä Valeur 2001, s. 113]

Spektrien päällekkäisyyttä kuvataan Försterin etäisyydellä (R_0). Energiansiirron nopeusvakio $k_T(r)$ saadaan seuraavasti:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad 2.14$$

Tässä r on etäisyys luovuttajan (D) ja vastaanottajan (A) välillä, ja τ_D on luovuttajamo le- kyylin elinaika ilman energiansiirtoa. Energiansiirron tehokkuus luovuttaja-vastaanot- taja-parille tietyllä etäisyydellä on:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad 2.15$$

Yhtälöstä 2.15. voidaan havaita, että energiansiirto riippuu suuresti etäisyydestä, ja sen teho heikkenee jyrkästi etäisyyden kasvaessa. (Lakowicz, 2006, s. 13)

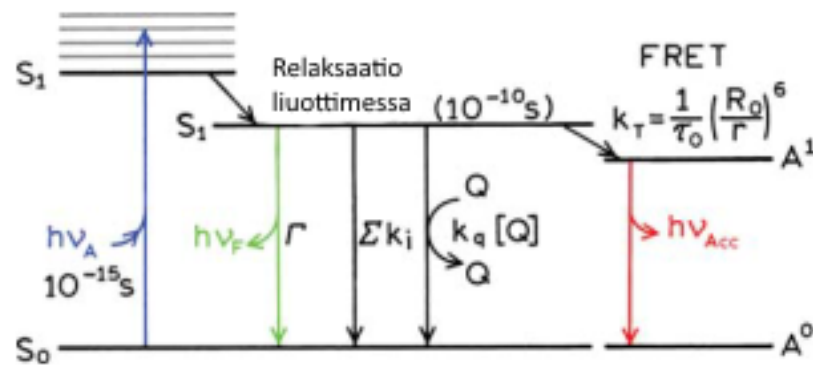
Taulukko 1. FRET-pareja. R_0 on Försterin etäisyys, missä energiansiirron tehokkuus on 50%

Luovuttaja	Vastaanottaja	R_0 (Å)
Fluoreseiini	Tetrametyylirodamiini	55
IAEDANS	Fluoreseiini	46
EDANS	Dabsyyli	33
Fluoreseiini	Fluoreseiini	44
BODIPY FL	BODIPY FL	57
Fluoreseiini	QSY 7 ja QSY 9 väriaineet	61

Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirtoa käytetään hyväksi solunsisäisten etäisyyksien ja prosessien etenemisen mittauksissa. Eri FRET-pareja on hyvin monia riippuen mitatta- vasta etäisyydestä, käytetystä viritysaallonpituudesta, happamuudesta, ja muista paramet- reista. Näistä esimerkkinä voidaan mainita fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) ja karbok- sisyanaatti Cy3; tässä parissa FITC toimii donorina ja Cy3 akseptorina ja niiden Försterin etäisyys R_0 , missä energiansiirron tehokkuus on 50%, on 55 Å. (Broudy *et al.* 1998) Muita FRET-pareja ja niiden Försterin etäisyyksiä on lueteltu taulukossa 1. (Arkin *et al.* 2012).

2.3.2 Dynaaminen sammuminen

Kuvassa 6. nähdään rinnakkain dynaamisen sammumisen ja fluoresenssi-resonanssi-energiansiirron prosessit. Dynaaminen sammuminen on diffuusiokontrolloitu, kun taas FRET vaatii molekyylien olevan lähekkäin, jotta energiatasojen välinen resonanssi olisi mahdollinen.



Kuva 6. Jablonskin diagrammi, joka esittää dynaamisen sammumisen ja fluoresenssi-resonanssi-energiansiirron (FRET). Σk_i kuvaa muita ei-säteileviä reittejä takaisin perustilaan. [Muokattu lähteestä Lakowicz 2006, s. 11]

Dynaamisessa sammumisessa fluoresenssin intensiteetin heikkenemistä kuvaa Stern-Volmerin yhtälö:

$$\frac{Q_0}{Q} = \frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D[Q] \quad 2.16$$

Tässä F on fluoresenssin intensiteetti sammuttajan kanssa ja F_0 ilman sammuttajaa, K on Stern-Volmerin sammumisvakio, k_q on bimolekulaarinen sammumisen nopeusvakio, τ_0 sammuttamaton elinaika, ja $[Q]$ sammuttavan molekyylin konsentraatio. K kuvaa fluoroforin herkkyyttä kyseiselle sammuttajalle. (Lakowicz 2006, s. 11)

Tämä Stern-Volmerin yhtälö voidaan johtaa myös tarkastelemalla emittoivien, virittyneiden fluorofoorien suhdetta kaikkiin fluorofooreihin. Tämä suhde (F/F_0) riippuu fluoresenssin vaimenemisen nopeusvakioista ilman sammuttajamolekyyliä (k_d) ja vaimenemisen nopeusvakioista sammuttajan läsnä ollessa ($k_d + k_q[Q]$):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{k_d}{k_d + k_q[Q]} = \frac{1}{1 + K_D} \quad 2.17$$

Koska törmäyksellinen vaimeneminen pienentää virittyneessä tilassa olevien molekyylien populaatiota, fluoresenssin elinaika ilman sammuttajaa (τ_0) ja sammuttajan kanssa (τ) saadaan seuraavista yhtälöistä:

$$\tau_0 = k_d^{-1} \quad 2.18$$

$$\tau = (k_d + k_q[Q])^{-1} \quad 2.19$$

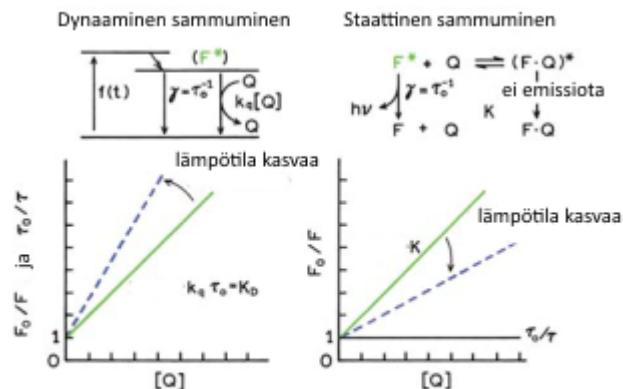
Yhtälöistä 2.18 ja 2.19 seuraa:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 2.20$$

Toisin sanoen dynaamisessa sammumisessa elinaika ja fluoresenssin intensiteetti heikkenevät molemmat:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad 2.21$$

Tämä on olennainen ero dynaamisen ja staattisen sammumisen välillä. (Lakowicz 2006, s. 280)

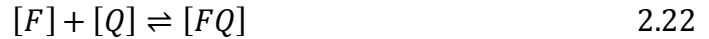


Kuva 7. Dynaamisen ja staattisen sammumisen vertailua. [Muokattu lähteestä Lakowicz 2006, s.280]

2.3.3 Staattinen sammuminen

Staattisessa sammumisessa fluorofoori muodostaa jo perustilassa fluoresoimattoman kompleksin sammuttajamolekyylin kanssa. Kun tämä kompleksin absorboi fotonin, se palaa välittömästi perustilaan ilman emissiota. (Lakowicz 2006, s. 282) Staattinen sammuminen on saanut nimensä siitä, että se ei ole riippuvainen diffuusiosta eikä molekyylien välisistä törmäyksistä. (Lakowicz 2006, s.11)

Fluoresenssin intensiteetti riippuu staattisessa sammumisessa sammuttajan konsentraatiosta. Sammuttajan ja fluoroforin välillä tapahtuva reaktio on seuraavan lainen:



Tämän pohjalta voidaan tarkastella kompleksin muodostumisen tasapainovakiota K_S :

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad 2.23$$

Tässä $[FQ]$ on kompleksin konsentraatio, $[F]$ vapaiden fluoroforien konsentraatio, ja $[Q]$ sammuttajan konsentraatio. Oletettaessa kompleksi täysin fluoresoimattomaksi, jäljellä olevan fluoresenssin osuus riippuu siitä osuudesta fluoroforeja, jotka eivät ole muodostaneet kompleksia: $f = F/F_0$.

Kun tiedetään, että fluoroforin kokonaiskonsentraatio $[F]_0$ on:

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad 2.24$$

saadaan seuraava yhtälö:

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad 2.25$$

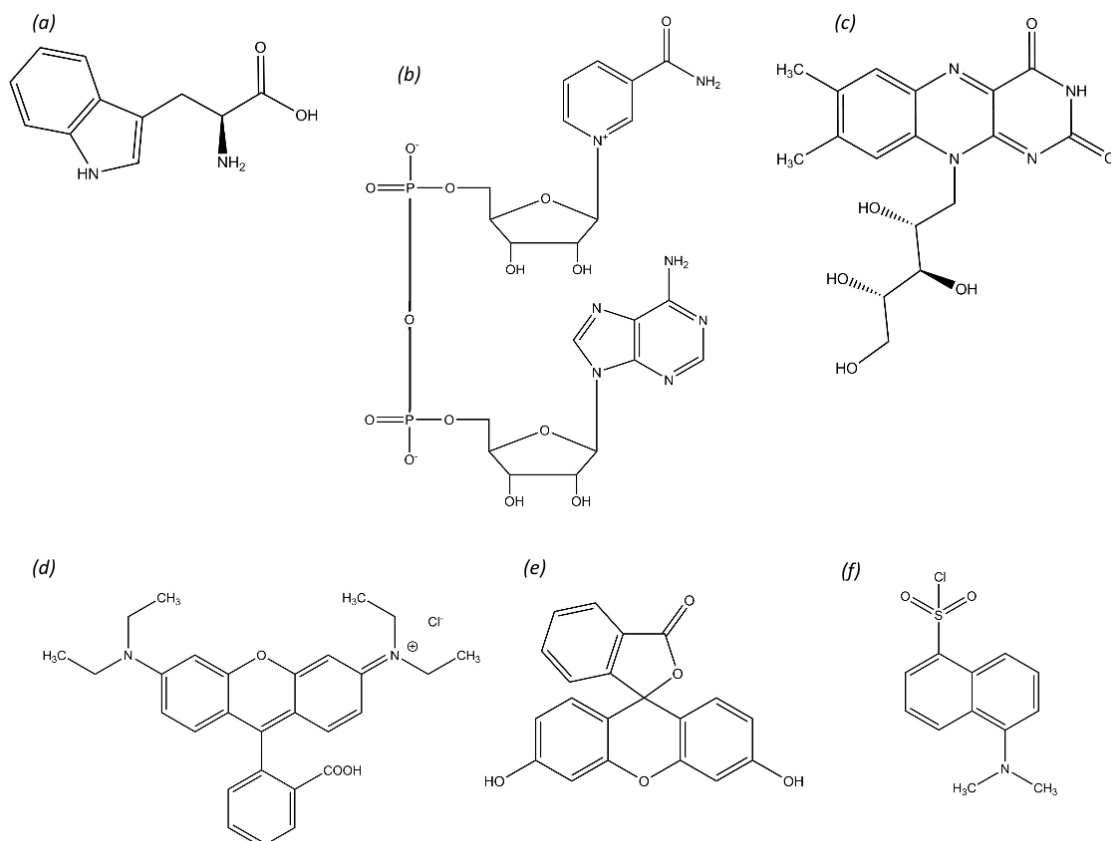
Käyttämällä fluoroforien konsentraatiota fluoresenssin intensiteetin sijaisena, yhtälöstä 2.19 saadaan uudelleenjärjestelmällä seuraava tulos:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad 2.26$$

Toisin sanoen fluoresenssin intensiteetti on lineaarisesti riippuvainen sammuttajan konsentraatiosta $[Q]$. Tämä on sama kuin yhtälö 2.16 dynaamiselle sammumiselle. Toisin kuin dynaamisessa sammumisessa, staattisessa sammumisessa fluoresenssin elinaika ei muutu, eli $\tau_0/\tau = 1$; ks. kuva 7. Tämän perusteella staattinen sammuminen voidaan erottaa dynaamisesta. (Lakowicz 2006, s. 282)

2.4 Fluoresoivat merkkiaineet

Solumittauksissa fluoroforit voidaan jakaa kahteen ryhmään: sisäisiin fluorofooreihin (intrinsic fluorophores), jotka ovat luonnossa esiintyviä aineita, ja ulkoisiin fluorofooreihin (extrinsic fluorophores), jotka on lisätty näytteeseen. Kuvassa 8. esitetään eräiden sisäisten ja ulkoisten fluoroforien molekyyliarakenteet.



Kuva 8. Eräiden fluoroforien rakenteita. Sisäiset fluoroforit (a) tryptofaani, (b) NAD⁺ ja (c) riboflaviini; ulkoiset fluoroforit (d) rodamiini B, (e) fluoressiini ja (f) dansyylikloridi (DNSCl)

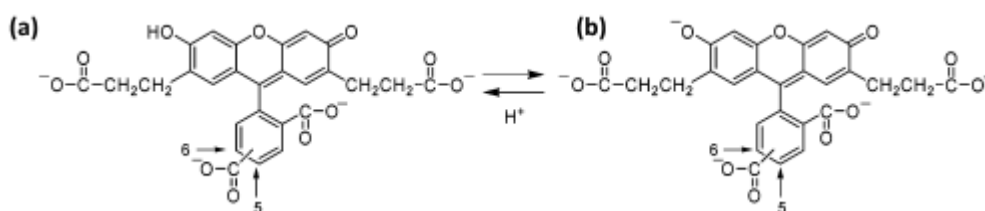
Sisäisiä fluoroforeja ovat esimerkiksi aromaattiset aminohapot (tryptofaani ja vähemmässä määrin tyrosiini ja fenyylialaniini), erilaiset flaviinit, sekä nikotiiniamidiadeniini-dinukleotidi (NAD⁺ / NADH). (Lakowicz 2006, s. 63) Ulkoiset fluoroforit puolestaan ovat väriaineita, joita lisätään näytteeseen sen saattamiseksi fluoresoivaksi, esimerkiksi yksinkertaisiin kuvantamistarkoituksiin, tai näytteen ominaisuuksien spektroskooppista määrittämistä varten. Ulkoisia fluoroforeja on hyvin runsaasti, ja lisää kehitetään koko ajan. Niiden rakenteita muuttelemalla pyritään yhä suurempaan tarkkuuteen ja parempaan

selektiivisyyteen. Fluoreseiini, rodamiini, dansyylikloridi ja lusigeniini ovat tunnettuja ulkoisia fluoroforeja. (Lakowicz 2006, s. 63)

2.4.1 Fluoreseiinijohdannaiset (BCECF ja Fluo-3)

Fluoreseiini on hyvin tunnettu ja helppokäyttöinen fluoresoiva pH-indikaattori, jonka ominaisuuksia tarkasteltiin osiossa 2.2.1. Fluoreseiinin käyttöä solunsisäisissä pH-mittauksissa kuitenkin rajoittaa sen taipumus vuotaa ulos soluista. Karboksifluoreseiini pysyy soluissa paremmin koska siinä on ylimääräinen negatiivinen varaus, mutta sen $pK_a \sim 6,5$ on matalampi kuin useimpien solujen sytosolin pH. (Johnson & Spence 2010, s. 887)

BCECF (2',7'-bis-(2-karboksietyyli)-5-(ja-6)-karboksifluoreseiini) kehitettiin vuonna 1982 korvaamaan fluoreseiinia ja karboksifluoreseiinia (Rink *et al.* 1982), ja se on nykyään eniten käytetty fluoresoiva pH-indikaattori solunsisäisiin pH-mittauksiin lähes neutraaleissa oloissa. (Boens *et al.* 2006, s.9334) Kuten kuvassa 9. nähdään, BCECF:llä on neljästä viiteen negatiivista varausta pH-välillä 7,0 – 8,0, minkä takia se pysyy hyvin soluissa, ja sen pK_a 6,98 on ihanteellinen useimpiin solunsisäisiin pH-mittauksiin. (Johnson & Spence, s. 887)

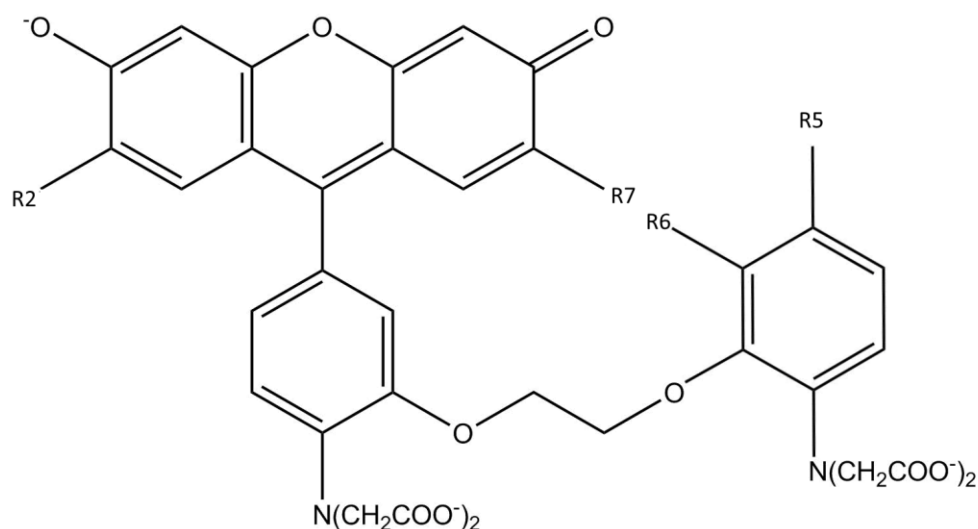


Kuva 9. BCECF:n tetra-anioninen muoto (a) ja penta-anioninen muoto (b) lähellä neutraalia pH:ta. [Muokattu lähteestä Boens *et al* 2006, s. 9335]

Kuten fluoreseiinilläkin, BCECF:n emäksisen fenolaatti-anionimuodon absorptiospektri on punasiirtynyt ja sen molaarinen absorptio on voimakkaampi kuin happamalla fenolimudolla. Sen sijaan BCECF:n fluoresenssispektrissä ei ole pH-riippuvaista siirtymää käytettäessä viritysaallonpituutta $\lambda_{ex} = 505$ nm. (Boens *et al.* 2006, s. 9334)

BCECF:a on käytetty esimerkiksi ikääntymisen aiheuttamien aivosolujen pH-muutosten tutkiminen (Bonnet *et al.* 2018), pH-mittauksiin tutkittaessa bikarbonaattianionien vaikutusta kemosensitivisiin neuroneihin (Gonçalves & Mulkey 2018), elävien solujen solunsisäisen pH:n mittaamiseen aikaerotteisessa fluoresenssimikroskopiassa (FLIM) (Hille *et al.* 2008), ja indometasiinin solunsisäisessä pH:ssa aiheuttamien muutosten tutkimiseen (Tsai *et al.* 2015).

Fluoreseiinista on kehitetty johdannaisia myös muihin tarkoituksiin kuin pH-indikaattoreiksi. Toinen tässä työssä käytetty fluoreseiinipohjainen merkkiaine oli Fluo-3 (Glysiini, N-[2-[[[2-[bis(karboksimetyyli)amino]-5-(2,7-dikloro-6-hydrokso-3-okso-3H-ksan-teeni-9-yyli)fen-oksy]metyyli]metyyli]oksy]-4-metyylifenyyli]-N-(karboksimetyyli)-, penta-ammonium-suola). Se on yksi useista kalsiumionien konsentraatiolle herkistä fluoreseiinijohdannaisista, jotka tunnetaan Fluo-merkkiaineina. Niiden yleinen rakenne on esitetty kuvassa 10. (Johnson & Spence 2010, s. 842)



Kuva 10. Fluo-merkkiaineiden perusrakenne. Fluo-3:ssa R2 ja R7 ovat klooriatomeja, R5 on metyyliryhmä (CH_3), ja R6 on vetyatomi.

Fluoresenssin riippuvuus Ca^{2+} -ionien konsentraatiosta on saatu aikaan liittämällä fluoreseiiniin kalsiumia sitova BAPTA-molekyyli, eli (1,2-bis(o-aminofenoksi)etaani- N,N,N',N' -tetraetikkahappo). (Minta *et al.* 1989) Fluo-3:n suolat eivät läpäise solukalvoa, joten se täytyy ladata soluihin erikseen. Siitä on saatavilla myös ei-fluoresoiva asetoksimetyyliesteri (AM), joka kulkeutuu soluihin itsenäisesti ja hydrolysoituu siellä Fluo-3:ksi. Kokeellisesti on osoitettu, että Fluo-3:n ominaisuudet spektroskopiassa eivät muutu riippumatta siitä tuodaanko se soluihin suolana vai AM-esterinä. (Kao *et al.* 1989).

Normaalisti Fluo-3 on lähes fluoresoimaton, mutta kun Fluo-3:n etikkahapposivuketjut muodostavat kelaatin kalsiumin kanssa, molekyylin fluoresenssi kasvaa erittäin voimakkaasti; kirjallisuudessa nähdään arvioita nelikymmenkertaisesta jopa satakertaiseen fluoresenssin intensiteettiin. Fluo-3:n pKa on $\sim 4,5$ joten se soveltuu hyvin käytettäväksi pH-alueella 5,0 – 8,0. (Minta *et al.*, 1989, s. 8175-8176)

Fluo-3:a on käytetty kalsiumionien konsentraation määrittämiseen monenlaisissa soveluksissa, esimerkiksi osteoblastien eli luuta muodostavien solujen kalsiumaineenvaihdunnan seuraamiseen eri tavoin pinnoitetulla titaanisubstraatilla (Staehle *et al.* 2018), viruslääke ribaviriinin aiheuttaman solujen itsetuhon seurantaan (Oswald *et al.* 2014), sekä sydämen eteisvärinän soluperäisten syiden tutkimiseen (Voigt *et al.* 2014).

2.4.2 LysoSensor-merkkiaineet

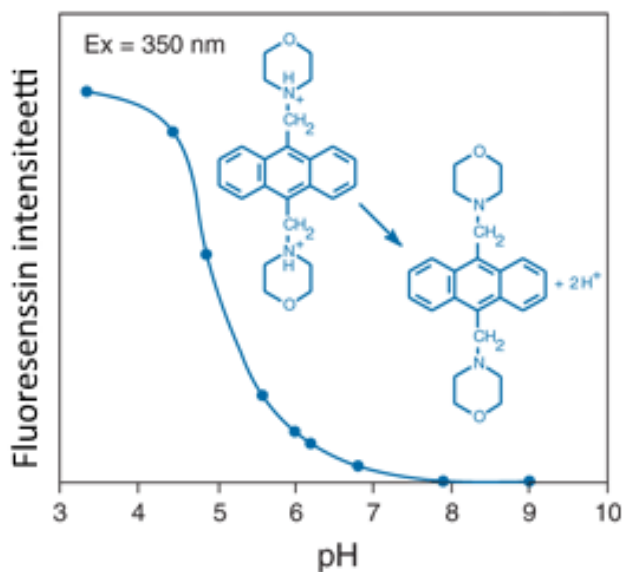
LysoSensor-merkkiaineet ovat Molecular Probesin (nytemmin osa Thermo Fisher Scientific Inc.) kehittämiä, happamiin olosuhteisiin tarkoitettuja fluoresoivia pH-indikaattoreita. Ne ovat lievästi emäksisiä ja hydrofobisia, ja hakeutuvat solussa itsestään happamiin olosuhteisiin, missä ne protonoituvat. Tällöin niiden emäksisten sivuketjujen sammuttava vaikutus kumoutuu, ja näin ollen ne fluoresoivat happamissa oloissa voimakkaammin kuin neutraaleissa. (Lin *et al.*, 1999) Taulukossa 2. on esitetty LysoSensor-merkkiaineiden ominaisuuksia. (Johnson & Spence 2010, s. 894)

Taulukko 2. *LysoSensor-merkkiaineiden ominaisuuksia. Absorptio- ja emissiohuippujen arvot on ilmoitettu pH:ssa 5,0 paitsi DND-160:llä. Sen ensimmäinen huippupari on pH:ssa 3,0 ja jälkimmäinen pH:ssa 7,0.*

Merkkiaine	Absorptio / emissio (nm)	pK _a	pH-alue
LysoSensor Blue DND-167	373/425	5,1	4,5 – 6,0
LysoSensor Green DND-153	442/505	7,5	6,5 – 8,0
LysoSensor Green DND-189	443/505	5,2	4,5 – 6,0
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	384/540 329/440	4,2	3,5 – 6,0

Lysosensor Yellow/Blue DND-160 soveltuu happamimpaan ympäristöön. Sen emissiohuippu siirtyy happamissa oloissa pitemmille aallonpituuksille, kuten taulukosta 2. nähdään. Niinpä se fluoresoi keltaisena matalilla pH-arvoilla ja sinisenä korkeammilla pH-arvoilla. Lysosensor Green DND-189 ja DND-153 fluoresoivat nimensä mukaisesti vihreinä, ja vaikka niiden pK_a ja käyttökelpoinen pH-alue vaihtelevat, niiden absorptio- ja emissiohuiput ovat lähes identtiset.

Tässä työssä käytetty LysoSensor-merkkiaine oli LysoSensor Blue DND-167. Sen rakenne on nähtävissä kuvassa 11. yhdessä sen pH-titrauskäyrän kanssa. Johtuen matalasta pK_a-arvosta 5,1 se ei fluoresoi juuri ollenkaan neutraaleissa oloissa, mutta fluoresoi voimakkaasti happamassa ympäristössä. LysoSensor Blue DND-167:lle on saatu kvanttisuhteeksi $Q = 0,80$ pH:ssa 3,0. (Lin *et al* 1999, s. 121)

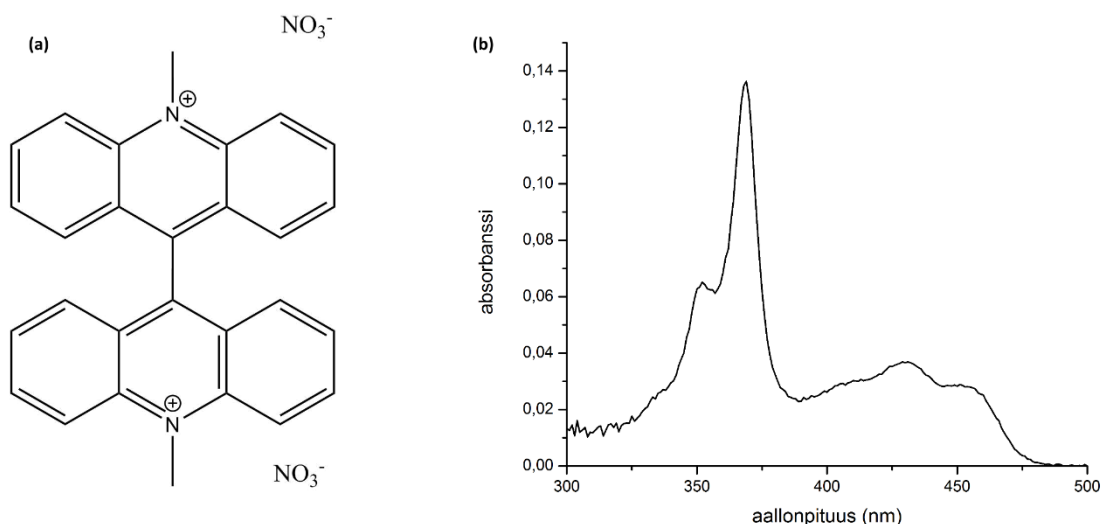


Kuva 11. *LysoSensorBlue DND-167:n rakenne ja pH-titrauskäyrä, $pK_a \sim 5,1$. (Muokattu lähteestä Johnson & Spence 2010, s. 895)*

LysoSensor Blue DND-167:ää on käytetty esimerkiksi bakteerien soluelimien tunnistamiseen (Seufferheld *et al.* 2003), elävien piilevien värjäämiseen seurattaessa mikroplanktonin ravintoketjua (Martínez *et al.* 2014), tutkittaessa malaria lääke artemisiniinin vaikutusta malarialoisiin (Mohd-Zamri *et al.* 2017) ja nekroottisen solukuoleman vaiheiden tutkimiseen (Giusti *et al.* 2009).

2.4.3 Lusigeniini

Lusigeniini eli bis-*N*-metyyliakridininiumnitraatti soveltuu kloridi-ionien konsentraation määrittämiseen, koska Cl^- -ionit sammuttavat sen fluoresenssin. Kyse on dynaamisesta sammumisesta, joka tapahtuu elektroninsiirron kautta. (Legg & Hercules 1969) Kuten kuvasta 12. nähdään, lusigeniinilla on kaksi absorptiomaksimia, 368 nm ja 455 nm. Sen emissiomaksimi on 497 nm, ja kvanttisuhde $Q = 0,67$. (Huber *et al.* 2003) Fosfaatti-, sulfaatti- ja nitraatti-ioneilla ei ole merkittävää vaikutusta lusigeniinin fluoresenssiin, joten sitä voidaan käyttää useissa puskuriliuoksissa niin kauan kuin ne eivät sisällä kloridi-ioneja. Lusigeniini soveltuu käytettäväksi liposomeissa ja solukalvon rakkuloissa eli vesikkeleissä, mutta sen pysyvyys solulimassa on huono, mikä voi vaikuttaa mittaustuloksiin. (Bowers *et al.* 1994)



Kuva 12. Lusigeniinin (*Bis-N-metyyliakridiniumnitraatti*) (a) molekyylirakenne ja (b) absorptiospektri. Näytteessä *c* (Cl) oli 200 mmol/l ja *c* (lusigeniini) oli 0,25 $\mu\text{mol/l}$.

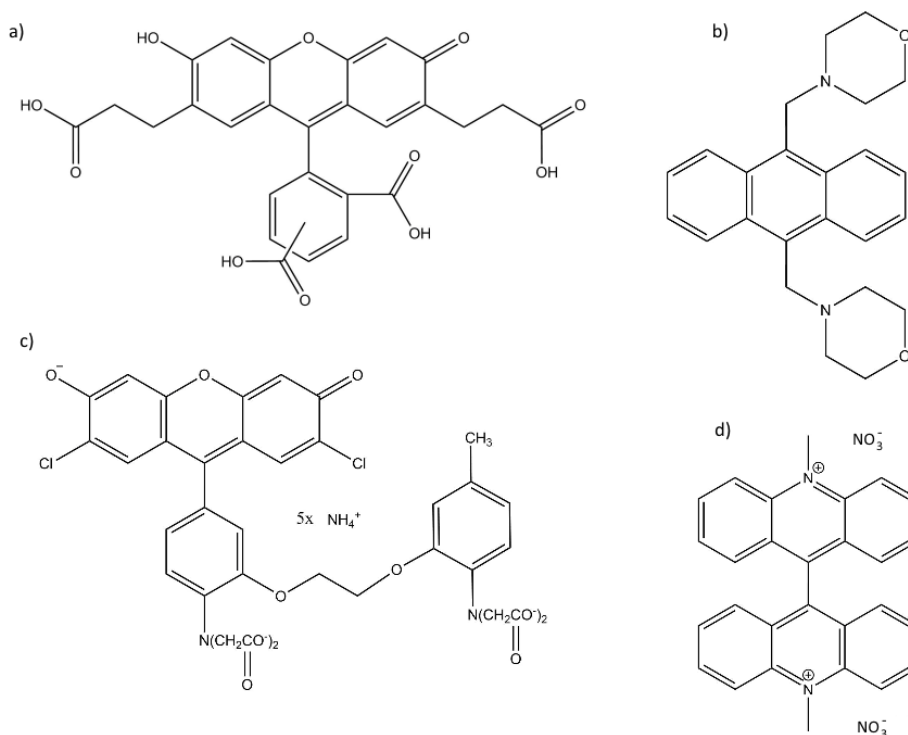
Kloridi-indikaattorina lusigeniinia on käytetty esimerkiksi vesikkelien kalvon läpi tapahtuvan kloridin kulkeutumisen mittaamiseen (McNally *et al.* 2008) ja fosfolipidikalvojen läpi tapahtuvaan kloridi-ionien siirtoon amfifiilisiä heptapeptidejä käyttäen (Ferdani *et al.* 2007). Sen käyttöä on tutkittu myös polyakryyliamidi-nanopartikkeleista valmistettujen solunsisäisten nanosensorien yhteydessä (Graefe *et al.* 2008), sekä aikaerotteiseen fluorometriaan ja elinaikaerotteiseen fluoresenssimikroskopiaan (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) käytettävien CdSe/ZnS –kvanttipisteiden valmistamiseen (Ruedas-Rama *et al.* 2012).

Lusigeniinia käytetään myös superoksidianionien (O_2^-) havaitsemiseen kemiluminesenssin kautta. Superoksidi on erittäin reaktiivinen ioni, ja se yhdistetään erilaisiin soluvaurioihin. Lusigeniinin avulla on tutkittu esimerkiksi superoksidin aiheuttamia verisuonten endoteelin vaurioita (Souza-Silva *et al.* 2018) ja analysoitu NADPH-oksidaasin toimintaa (Heumüller *et al.* 2008).

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Materiaalit

Työssä tarkasteltiin neljää eri fluoresoivaa merkkiainetta. Näistä kaksi reagoi pH:n muutokseen, yksi kalsiumionien pitoisuuteen, ja yksi kloridi-ionien pitoisuuteen. pH-riippuvaiset merkkiaineet olivat BCECF (2',7'-Bis-(2-karboksietyyli)-5-(ja-6)-karboksifluoreseini) ja LysoSensor Blue DND-167 (4,4'-(antraseeni-9,10-diyyliidimetaanidiyyli)dimorfoliini). Kalsiumioneihin reagoiva merkkiaine oli Fluo-3 (Glysiini, N-[2-[[[2-bis(karboksimeetyli)amino]-5-(2,7-dikloro-6-hydroksy-3-okso-3H-ksanteeni-9-yyli)fenoksy]metyyli]metyyli]oksy]-4-metyylifenyyli]-N-(karboksimeetyli)-, penta-ammonium-suola). Kloridi-ioneihin reagoiva merkkiaine oli lusigeniini (bis-N-metyyliakridiniumnitraatti). Merkkiaineiden rakenteet on esitetty kuvassa 13.



Kuva 13. Käytettyjen merkkiaineiden kemialliset rakenteet: (a) BCECF, (b) LysoSensor Blue DND-167, (c) Fluo-3, (d) lusigeniini

Kiinteistä merkkiaineista (BCECF, Fluo-3 ja lusigeniini) valmistettiin ensin kantaliuos käyttäen soveliaista liuotinta. LysoSensor Blue DND-167 tuli valmistajalta valmiina 1mM

dimetyylisulfoksidi-liuoksena (DMSO). Mittauksia varten näistä kantaliuoksista valmistettiin varsinainen näyte laimentamalla ultrapuhdaan veteen tai fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (1x PBS) kuten taulukossa 3. on esitetty.

Taulukko 3. Merkkiaineiden kantaliuosten konsentraatio c , käytetty liuotin, sekä merkkiaineen valmistaja

Merkkiaine	c (mM)	Liuotin	Valmistaja
BCECF	0,48	ultrapuhdas vesi	Thermo Fisher Scientific, USA
DND-167	1,0	DMSO	Thermo Fisher Scientific, USA
Fluo-3	0,585	ultrapuhdas vesi	Thermo Fisher Scientific, USA
Lusigeniini	0,1	DMSO	Merck KGaA, Saksa

Näistä kaikista näytteistä mitattiin eksitaatio- ja emissiospektrit, tarvittaessa myös absorptiospektri mittausten kalibroimista varten, sekä fluoresenssin vaimeneminen aika-erotteista yksittäisefotonilaskentaa käyttäen.

Spektroskooppisissa mittauksissa käytettiin, viritysaallonpituudesta riippuen, joko kvartsilasista tai optisesta lasista valmistettuja kyvettipareja (Starna Scientific Ltd., UK). Kaikkien kyvettien optinen matka oli 10 mm.

3.1.1 BCECF

BCECF-näytteet valmistettiin 1x PBS:stä valmistettuun puskuriliuossarjaan, jonka pH-arvot säädettiin kohdalleen vetykloridia ja natriumhydroksidia käyttäen. Tarkat pH-arvot määritettiin pH-mittarilla, ja ne on esitetty taulukossa 4. 14 μ l BCECF:n 0,48 mM kantaliuosta lisättiin 3 millilitraan puskuriliuosta. Näytteiden konsentraatio oli täten 2,24 mmol/l.

Taulukko 4. BCECF puskuriliuossarjan tavoitellut ja mitatut pH:t

tavoite-pH	5,0	5,4	5,8	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	8,0
tarkka pH	4,95	5,40	5,80	6,22	6,42	6,56	6,83	6,99	7,19	7,39	7,62	8,03

3.1.2 LysoSensor Blue DND-167

LysoSensor Blue -näytteet valmistettiin kuten BCECF:n kohdalla mutta eri pH-arvoin. Ne on esitetty taulukossa 5. 20 µl DND-167:n 0,1 mM kantaliuosta laimennettiin 3 millilitraan puskuriliuosta. Näytteiden konsentraatio oli täten 0,67 mmol/l.

Taulukko 5. *LysoSensor Blue puskuriliuossarjan tavoitellut ja mitatut pH:t*

tavoite-pH	3,0	3,4	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6	6,0	6,6	7,4
tarkka pH	2,95	3,41	4,02	4,43	4,79	5,21	5,60	6,02	6,58	7,39

3.1.3 Fluo-3

Fluo-3 -näytteet valmistettiin ultrapuhtaaseen veteen. Ensin 20 µl Fluo-3:n 0,585 mM kantaliuosta laimennettiin 3 millilitraan vettä, joten konsentraatioksi tuli 3,9 µmol/l. Tämän jälkeen lisättiin kuhunkin näytteeseen 0,01 mM kalsiumkloridiliuosta halutun kalsiumkonsentraation saavuttamiseksi.

Mitattaessa todettiin kalsiumkloridiliuoksen pH:n pienenevän kalsiumpitoisuuden kasvaessa, kuten taulukossa 6. on esitetty. Muutos oli kuitenkin varsin pieni, eikä sen katsottu vaikuttavan lopputulokseen haitallisesti.

Taulukko 6. *Fluo-3 näytteiden kalsiumkloridipitoisuudet ja pH-arvot*

c Ca ²⁺ (µM)	5,0	2,8	1,4	0,7	0,35	0,25
pH	5,33	6,06	6,62	6,59	6,58	6,79

3.1.4 Lusigeniini

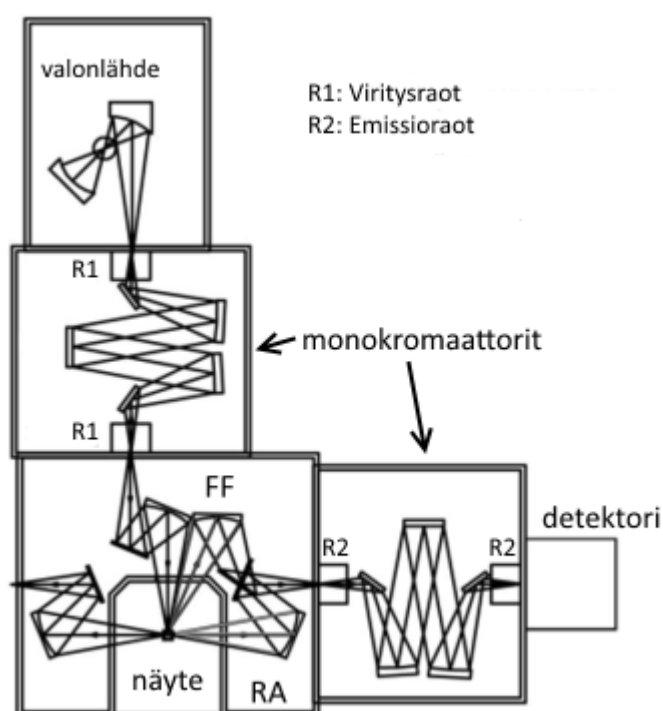
Lusigeniininäytteet valmistettiin suolaliuoksiin, jotka tehtiin laimentamalla 200 mM NaCl-liuosta ultrapuhtaaseen veteen. Tämän jälkeen lisättiin aina 7,5 µl 0,1 mM lusigeniinin kantaliuosta 3 millilitraan suolaliuosta, niin että lusigeniinin lopullinen konsentraatio oli 0,25 µmol/l. Alustavien spektrimittausten pohjalta laadittiin suolaliuosten sarja, jossa NaCl-pitoisuus vaihteli 0 – 200 mM välillä.

3.2 Spektroskooppiset menetelmät

Työssä mitattiin ensiksi näytteiden absorptiospektrit sekä eksitaatio- ja fluoresenssispektrien intensiteetit. Tämän jälkeen näytteistä mitattiin fluoresenssin elinajat käyttäen aikaerotteista yksittäisfotonilaskentaa (TCSPC).

3.2.1 Fluoresenssi- ja eksitaatiospektrit

Näytteiden fluoresenssi- ja eksitaatiospektrit mitattiin ensisijaisesti käyttäen Fluorolog Jobin Yvon-SPEX –spektrofluorometriä (Horiba Ltd., Japani). Lysosensor Blue DND-167 –näytteiden kanssa käytettiin kuitenkin Edinburgh Instruments FLS 1000 –spektrofluorometriä (Edinburgh Instruments Ltd., UK).



Kuva 14. Spektrofotometrin rakenne. Muokattu lähteestä HORIBA, 2014

Kuvassa 14 on esitetty yleisluontoisesti spektrofotometrin rakenne. Valonlähteenä toimivan xenonlampun ja näytteen välillä on monokromaattori, jonka avulla valkoisesta valosta saadaan erotettua haluttu virtysaallonpituus. Virtysraon leveyttä muuttamalla säädetään mittausaallonpituuden tarkkuutta. (Valeur 2001, s.156-158) Kuten yleensä neste-mäisillä näytteillä, fluoresenssi mitattiin 90 asteen kulmassa (RA, right angle conformation) virittävään valoon nähden, jotta heijastusten vaikutus on mahdollisimman pieni. Emittoituva valo kulkee emissioraon kautta toiseen monokromaattoriin ja sieltä detektoriin. Monokromaattori erottelee detektorille pääsevät aallonpituusalueet, ja emissioraon leveyttä muuttamalla säädetään mitattavan aallonpituuden tarkkuutta. (Valeur 2001, s.156-158) Käytetyt virtys- ja monitorointiaallonpituudet esitetään taulukossa 7.

Taulukko 7. Mittausparametrit spektri- ja elinaikamittauksille; viritysaallonpituus (λ_{ex}), monitorointiaallonpituus (λ_{mon}), mittausahue ($\Delta\lambda$), ja virittävän laserpulssin puoliarvoväveys (FWHM)

	Emissiospektri		Eksitaatiospektri		TCSPC		
Merkkiaine	λ_{ex} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ_{mon} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{mon} (nm)	FWHM (ps)
BCECF	475	485-700	540	300-530	483	520	128
DND-167	375	385-600	430	300-420	375	425	64
Fluo-3	485	495-700	540	350-550	483	525	128
lusigeniini	370	380-600	505	300-459	375	505	64
	405	415-700					

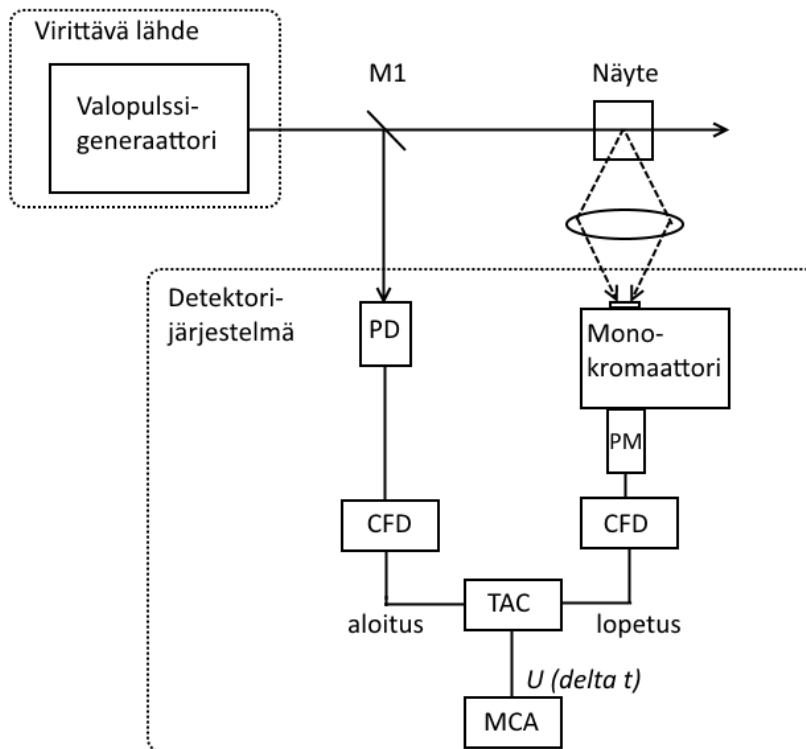
3.2.2 Absorptiospektrofotometria

Osalle näytteistä mitattiin myös absorptiospektrit, jotta saataisiin selville fluoresenssi- ja eksitaatiospektrien mittaamiseen sopiva merkkiaineen pitoisuus. Näin saatuja absorptiospektrejä voidaan myös verrata eksitaatiospektreihin, koska ne ovat yleensä hyvin samankaltaiset. Jos tässä olisi ilmennyt huomattavia eroja, se olisi voinut olla osoitus merkkiaineessa olevista epäpuhtauksista, fluoroforien hajoamisesta tai muusta häiriötekijästä.

Absorptiospektrit mitattiin kemian ja biotekniikan laitoksen laserlaboratoriossa olevalla Shimadzu UV-3600 –spektrofotometrillä (Shimadzu Corporation, Japani).

3.2.3 Aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta

Aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta (time correlated single photon counting, TCSPC) on valokemian mittaamenetelmä, jolla kuvataan fluoresenssin vaimentumista. Se on yksi tärkeimmistä aikariippuvaisen emission mittaamenetelmistä, kun on kyse aikaskaaloista nanosekuntien suuruusluokassa. Se soveltuu erityisen hyvin orgaanisen valokemian tarpeisiin. (Tkachenko 2006, s. 151) Kuvassa 15. on esitetty TCSPC-laitteiston periaatteellinen rakenne.



Kuva 15. Aikaerotteisessa yksittäisfotonilaskennassa käytettävä laitteisto. *M1 on kvartsilasinen säteenjakaja, PD fotodiodi, PM valomonistinputki, CFD constant fraction discriminator, TAC on aika-amplitudi -muunnin, ja MCA monikanava-analysaattori. Muokattu lähteestä Tkachenko 2006, s. 152.*

Aluksi viritetään näyte laserpulsseilla, ja TCSPC-järjestelmä mittaa ajan, joka kuluu virityspulssista yksittäisen emittoituneen fotonin saapumiseen detektoriin. Havaitut fotonit merkitään histogrammiin, jossa x-akselilla on aika virityksestä havaintohetkeen, ja y-akselilla on fotonien määrä. Tämä toistuu, kunnes ennalta asetetut parametrit täyttyvät ja histogrammista voidaan havaita fluoresenssin vaimeneminen.

Taulukossa 7. esitettiin myös TCSPC-mittauksissa käytetyt viritys- ja monitorointiaallonpituudet sekä virittävän laserpulsstin puoliarvoleveydet kullekin näytteelle.

4. TULOKSET

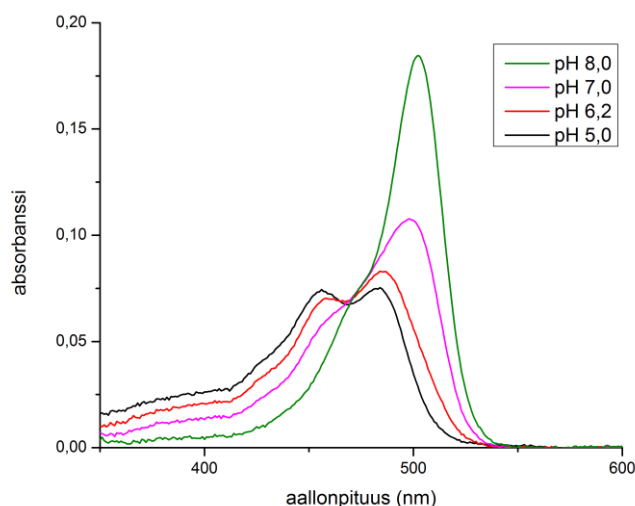
Mittauksissa tarkasteltiin merkkiaineiden fluoresenssia, sen intensiteettiä ja elinaikaa, ja näiden riippuvuutta mittaolosuhteista. Kahdella merkkiaineella (BCECF ja LysoSensor Blue) kyse oli pH-riippuvuudesta, yhdellä (Fluo-3) kalsiumionien konsentraatiosta, ja yhdellä (lusigeniini) kloridi-ionien konsentraatiosta.

4.1 Fluoresenssin riippuvuus pH:sta

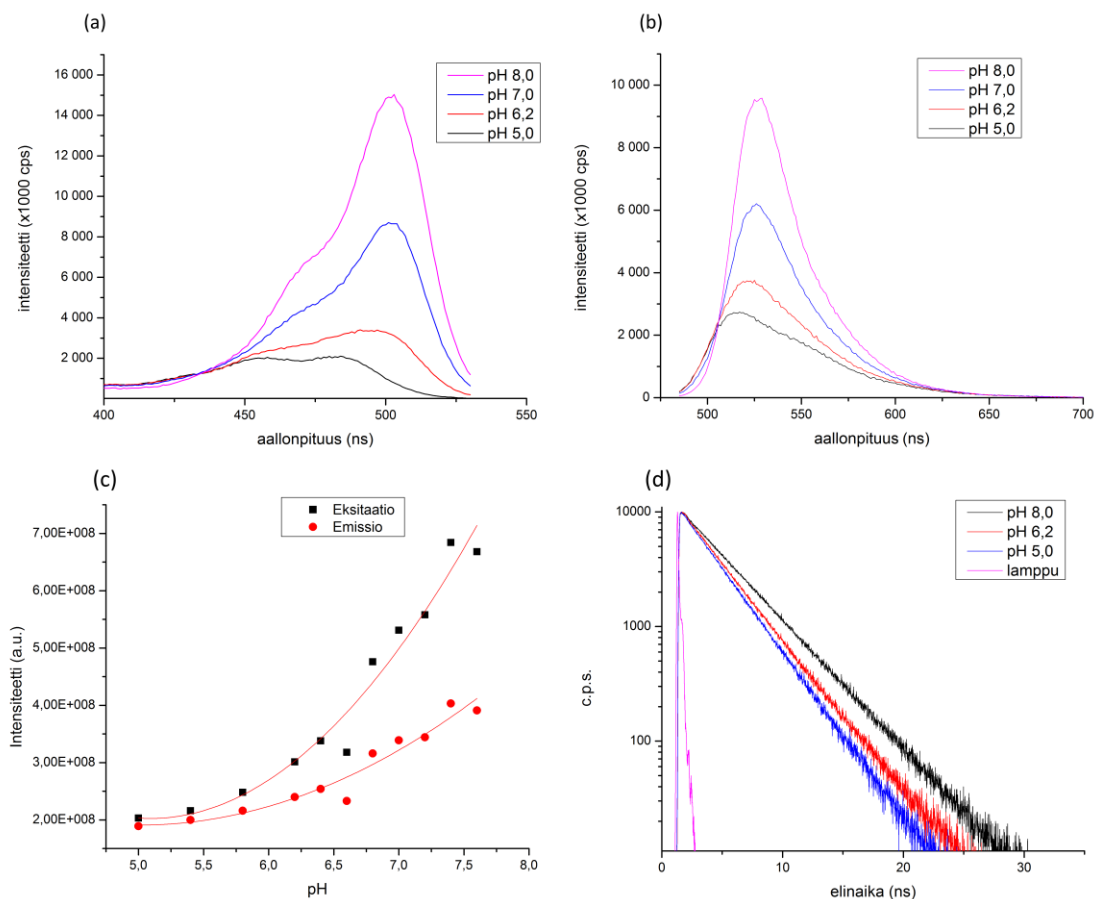
Fluoresenssin pH-riippuvaisuutta tarkasteltiin BCECF:llä, joka oli tarkoitettu neutraaleihin tai lievästi happamiin oloihin, ja LysoSensor Blue DND-167:llä joka puolestaan oli tarkoitettu selvästi happamaan ympäristöön.

4.1.1 BCECF

Kuvassa 16. on esitetty BCECF:n absorptiospektrit. Havaittiin, että happamissa oloissa spektrissä on kaksi absorptiohuippua, pH 5,0:lla kohdissa 456 nm ja 484 nm. Lisäksi nähdään lähes isosbestinen piste 470 nm kohdalla. Spektrien muoto muuttuu fluoroforin happaman fenolimudon ja emäksisen fenolaattimudon tasapainon vaihdellella. pH:n kasvaessa ensimmäinen absorptiohuippu hiipuu pelkäksi olkapääksi spektrissä, ja jälkimmäinen huippu voimistuu huomattavasti siirtyen pitemmille aallonpituuksille niin, että pH 8,0:lla se on 502 nm.



Kuva 16. BCECF:n absorptiospektrit neljässä eri pH:ssa. Näytteen BCECF-konsentraatio 2,24 mmol/l



Kuva 17. BCECF:n eksitaatiospektrit 430 nm monitorointiaallonpituudella (a), fluoresenssispektrit 375 nm viritysaallonpituudella (b), eksitaatio- ja emissiospektrien pinta-alat (c) ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat 483 nm viritysaallonpituudella ja 520 nm monitorointiaallonpituudella (d) eri pH:lla. BCECF-konsentraatio oli 2,24 mmol/l.

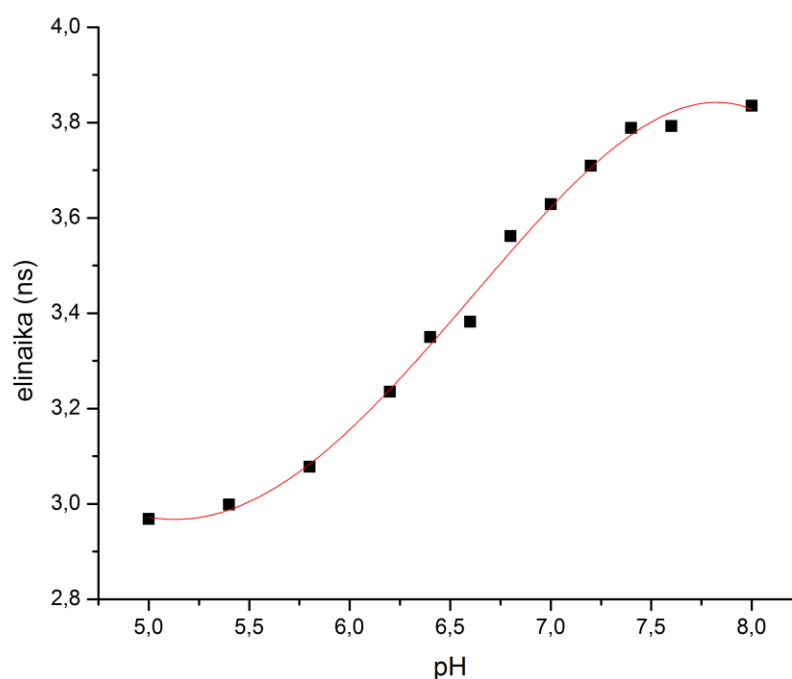
Kuvassa 17. esitetään kootusti fluoresenssimittausten tulokset BCECF:lle. Näytteen eksitaatiospektrit, kuva 17 (a), ovat muodoltaan pääpiirteissään samanlaisia kuin kuvassa 16. esitetty absorptiospektri, ja niissä havaitaan sama pH-riippuvuus. Happamissa olosuhteissa eksitaatiospektrissä on kaksi suunnilleen yhtä voimakasta huippua. Siirryttäessä kohti neutraalia pH:ta kokonaisintensiteetti kasvaa, ja pitempää aallonpituutta vastaava huippu voimistuu huomattavasti, niin että lyhyempää aallonpituutta vastaava huippu muodostaa enää pienen olkapään spektriin. Samalla oikeanpuoleinen huippu siirtyy hieman pidemmälle aallonpituudelle.

Emissiospektrin, kuva 17 (b), muoto ei muutu happamuuden mukaan, mutta sen intensiteetissä ja spektrihiipun paikassa havaitaan selkeä pH-riippuvuus. Happamissa oloissa spektrihiippu on matalampi ja lyhyemmällä aallonpituudella kuin neutraaleissa tai lievästi emäksisissä oloissa.

Kuvassa 17 (c) esitetään BCECF:n eksitaatio- ja fluoresenssispektrien pinta-alat eri pH:lla. Ne kuvaavat kokonaisintensiteetin kasvamista siirryttäessä happamasta neutraaliin tai lievästi emäksiseen ympäristöön. Havaitaan eksitaation intensiteetin voimistuvan selvästi enemmän kuin emission intensiteetin, kun pH kasvaa.

BCECF:n elinaikaa mitattiin 483 nm viritysaallonpituudella, joka osuu varsin lähelle näytteen eksitaatiospektrin maksimia. Mahdollisten heijastusten poistamiseksi käytettiin myös longpass-suodatinta, joka leikkasi pois alle 500 nm aallonpituudet. Kuvassa 17 (d) nähdään fluoresenssin vaimeneminen neljällä eri pH:lla. Voidaan nähdä, että eri näytteiden välillä on selvä ero elinajassa, ja että vaimeneminen on yksiekspotentiaalista. Histogrammien perusteella laskettiin fluoresenssin elinajat käyttäen TTY:n Decay Fit -ohjelmistoa. Elinajat virheineen löytyvät taulukoituina liitteestä A.

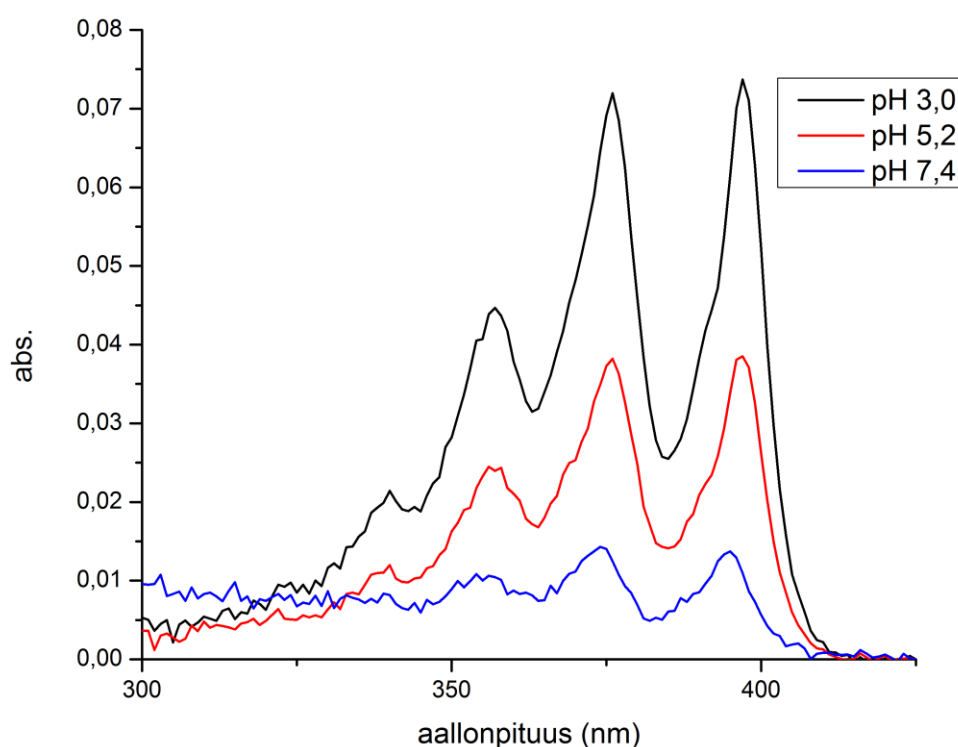
Kuvassa 18. on esitetty fluoresenssin elinajan muuttuminen pH:n suhteen välillä pH 5,0 – pH 8,0. Havaittiin, että näytteen pH:lla on selvä yhteys fluoresenssin elinaikaan siten, että neutraaleissa oloissa se on pitempi ja happamissa lyhyempi. Elinajat muodostavat S-muotoisen kuvaajan, jossa elinaikojen muutos on voimakkaampaa ja suunnilleen lineaarista välillä pH 5,8 – 7,4. Pisimmän ja lyhimmän mitatun elinajan ero on n. 0,87 nanosekuntia. pH-välin keskialueella elinaikojen ero on 0,1 ns luokkaa per 0,2 pH-yksikköä.



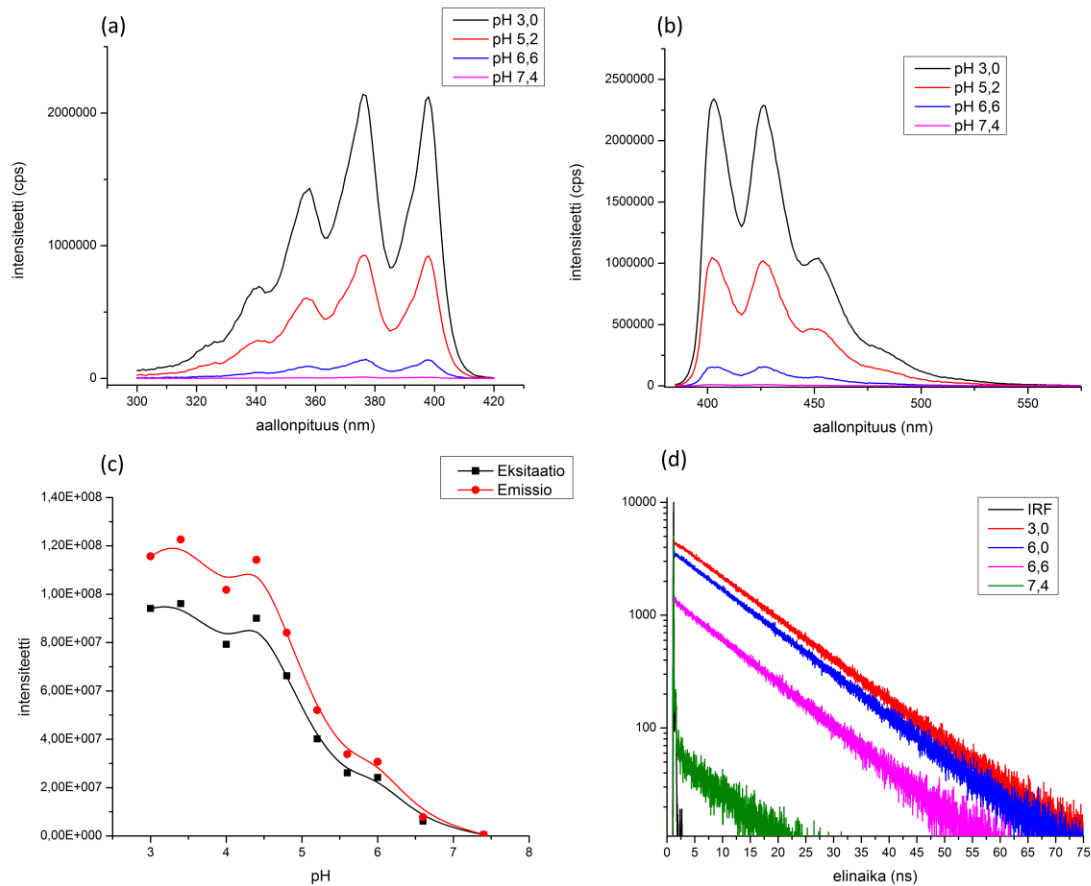
Kuva 18. BCECF:n fluoresenssin elinaika eri pH-arvoilla välillä 5,0 – 8,0.

4.1.2 LysoSensorBlue

Kuvassa 19. on esitetty LysoSensor Bluen absorptiospektrit. Spektrissä on neljä huippua, joissa havaitaan hienoista siirtymistä lyhyemmille aallonpituuksille, kun pH kasvaa. pH-arvolla 3,0 huiput ovat kohdissa 340 nm, 357 nm, 376 nm ja 397 nm. Näistä kaksi viimeksi mainittua ovat voimakkaimmat. Absorptiospektrin yleismuoto ei ole pH-riippuva, mutta absorptiovoimakkuus laskee merkittävästi, kun siirrytään happamista neutraaleihin oloihin (pH 3,0 – 7,4). Samalla absorptiohuippujen intensiteettierot pienenevät.



Kuva 19. *LysoSensor Bluen absorptiospektrit kolmella eri pH:lla. Näytteen konsentraatio oli 0,67 $\mu\text{mol/l}$.*



Kuva 20. *LysoSensor Bluen* eksitaatiospektrit (a), fluoresenssispektrit (b), eksitaatio- ja emissiospektrien pinta-alat (c) ja fluoresenssin vaimenemiskuvajaajat (d) eri pH:lla. *LysoSensor Bluen* konsentraatio oli $0,67 \mu\text{mol/l}$. Monitorointiaallonpituus eksitaatiospektrille oli 540 nm ja viritysaallonpituus fluoresenssispektrille 475 nm . Elinaikamittauksissa käytetty viritysaallonpituus oli 375 nm ja monitorointiaallonpituus 425 nm

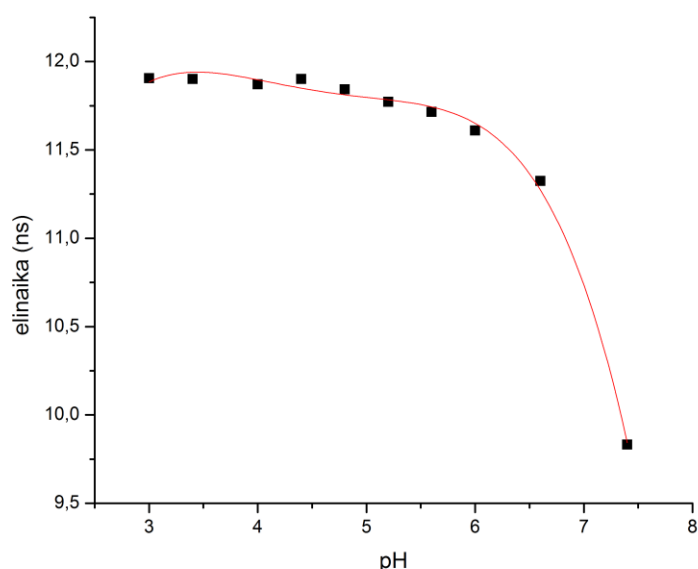
Kuvassa 20. esitetään kootusti fluoresenssimittausten tulokset *LysoSensor Blue*lle. Näytteen eksitaatiospektri, kuva 29 (a), on muodoltaan pääpiirteissään samanlainen kuin kuvassa 4 esitetty absorptiospektri. Happamissa olosuhteissa spektrikäyrässä on neljä näkyvää huippua, joista kaksi oikeanpuoleisinta ovat selvästi voimakkaimmat. Siirryttäessä kohti neutraalia pH:ta kokonaisintensiteetti pienenee jyrkästi, ja huippujen intensiteettien erot pienenevät. pH 6,6:ssa huiput erottuvat enää matalana aaltoiluna, ja pH 7,4:ssä intensiteetti on erittäin heikko.

Fluoresenssispektrissä, kuva 20 (b), nähdään kolme huippua, pH 3,0:lle kohdissa 403 nm , 426 nm ja 452 nm . Kuten eksitaatiospektrissä, spektrin perusmuoto ei muutu pH:n muuttuessa, mutta intensiteetti heikkenee ja huippujen intensiteettierot pienenevät samaan tapaan.

Kuvassa 20 (c) esitetään LysoSensor Bluen fluoresenssi- ja eksitaatiospektrin pinta-alat eri pH-arvoilla. Nähdään kokonaisintensiteetin pienenevän pH:n kasvaessa, ja että muutos on voimakkainta alueella pH 4,4 – 5,6. Tämä täsmää absorption heikkenemisen kanssa, ja viittaa siihen, että fluoresenssin intensiteetin heikkeneminen johtuu absorption pienenemisestä.

LysoSensor Bluen elinaikaa mitattiin 375 nm viritysaallonpituudella, joka osuu hyvin toisen eksitaatiospektrin voimakkaista huipuista kohdalle. Mahdollisten heijastusten ja muiden häiriöiden poistamiseksi käytettiin longpass-suodatinta, joka leikkasi pois alle 420 nm aallonpituudet. Kuvassa 20 (d) nähdään fluoresenssin vaimeneminen neljällä eri pH:lla sekä instrumenttifunktio (IRF). Vaimeneminen on yksiekspotentiaalista välillä pH 3,0 – 6,0 ja ero eri pH-arvojen välillä on vähäinen. Selvä muutos nähdään vain pH-arvoilla, missä kokonaisintensiteetti on jo hyvin heikko. Fluoresenssin elinajat virheineen löytyvät taulukoituina liitteestä A.

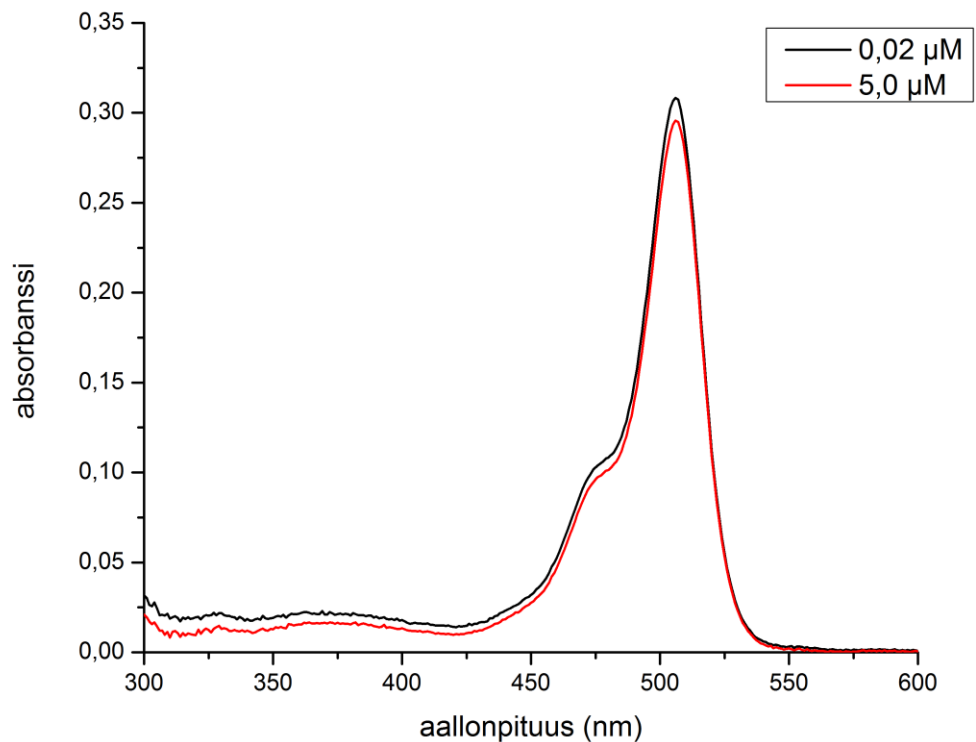
Kuvassa 21. on esitetty LysoSensor Bluen fluoresenssin elinajan muuttuminen pH:n suhteen välillä pH 3,0 – 7,4. Kuten kuvasta voi nähdä, havaittiin, että elin aika pieneni välillä pH 3,0 – 6,0 suunnilleen lineaarisesti mutta vain hyvin vähän, yhteensä alle 0,5 ns. Selvästi voimakkaampi muutos havaittiin välillä pH 6,0 – 7,4, mutta sekin jää yhteensä alle 1,5 ns. Intensiteetin heikkous tällä pH-alueella kuitenkin heikentää tuloksen luotettavuutta.



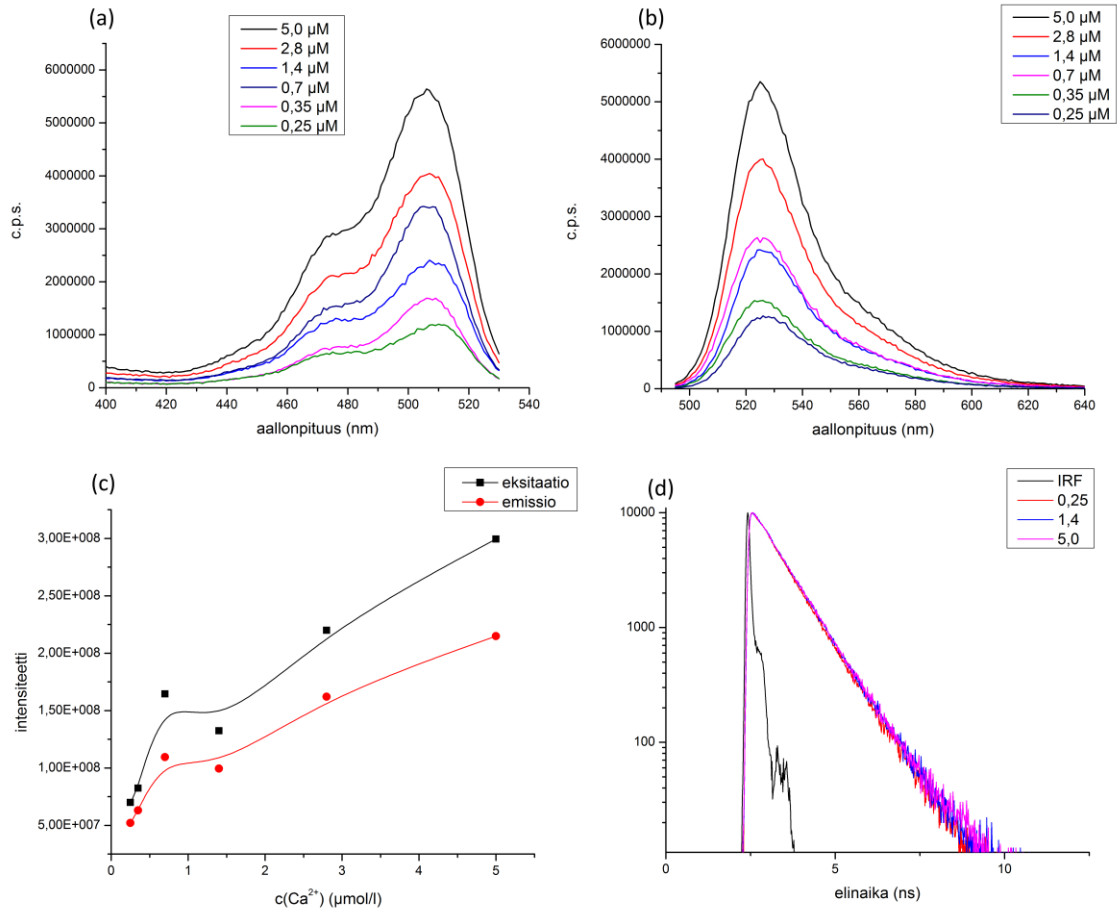
Kuva 21. *LysoSensor Bluen fluoresenssin elin aika eri pH-arvoilla välillä 3,0 – 7,8.*

4.2 Fluoresenssin riippuvuus kalsiumionien konsentraatiosta

Kalsiumkonsentraatioon reagoivana merkkiaineena oli Fluo-3. Se fluoresoi sitä voimakkaammin, mitä enemmän kalsiumioneja näyteliuoksessa on. Kuvassa 22. on esitetty Fluo-3:n absorptiospektrit kahdella eri kalsiumpitoisuudella. Kuten nähdään, sen paremmin spektrin muoto kuin intensiteettikään eivät muutu, vaikka kalsiumionien konsentraatio 250-kertaistuu. Kalsiumin sitoutuminen ei siis vaikuta fluoroforin perustilaan, vaan ainoastaan virittyneeseen tilaan.



Kuva 22. Fluo-3:n absorbtiospektrit, kun CaCl_2 -pitoisuus on $0,02 \mu\text{mol/l}$ ja $5,0 \mu\text{mol/l}$. $c(\text{Fluo-3})$ oli $3,9 \mu\text{mol/l}$.



Kuva 23. *Fluo-3:n eksitaatiospektrit (a), emissiospektrit (b), eksitaatio- ja emissiospektrien pinta-alat (c) ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat (d). Fluo-3:n konsentraatio oli $3,9 \mu\text{mol/l}$. Monitorointiaallonpituus eksitaatiospektrille oli 540 nm ja viritysaallonpituus emissiospektrille 485 nm . Elinaikamittauksissa käytetty viritysaallonpituus oli 483 nm ja monitorointiaallonpituus 525 nm*

Kuvassa 23. esitetään kootusti fluoresenssimittausten tulokset Fluo-3:lle. Näytteen eksitaatiospektri, kuva 23 (a), on muodoltaan pääpiirteissään samanlainen kuin kuvassa 22 esitetty absorptiospektri, mutta oikeanpuoleisen huipun intensiteettiero vasemmanpuoleiseen olkapäähän on pienempi. Spektrihiippujen paikoissa ei tapahdu merkittävää muutosta kalsiumionien konsentraation muuttuessa. Emissiospektri, kuva 23 (b), on yksinkertainen eikä sen muoto muutu kalsiumkonsentraation muuttuessa.

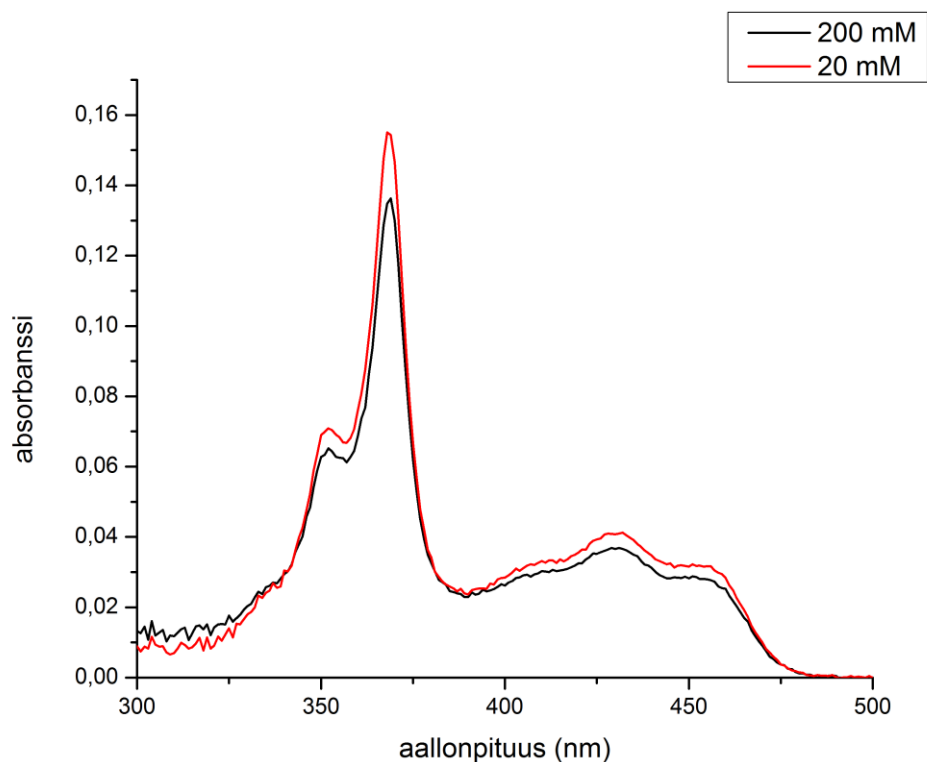
Kuvassa 23 (c) esitetään Fluo-3:n eksitaatio- ja fluoresenssispektrien pinta-alat eri pH-arvoilla. Spektrin pinta-alan pieneneminen kalsiumkonsentraation pienentyessä on muutoin lineaarista, mutta $0,7 \mu\text{mol/l}$ kohdalla intensiteetissä näkyy voimakas nousu. Kyse on mahdollisesti tasapainopisteestä.

Elinaikamittauksissa käytettiin 483 nm viritysaallonpituutta, joka osuu hyvin Fluo-3:n eksitaatiospektrin ”olkapään” alueelle. Mittauksissa ei käytetty suodattimia. Kuvassa

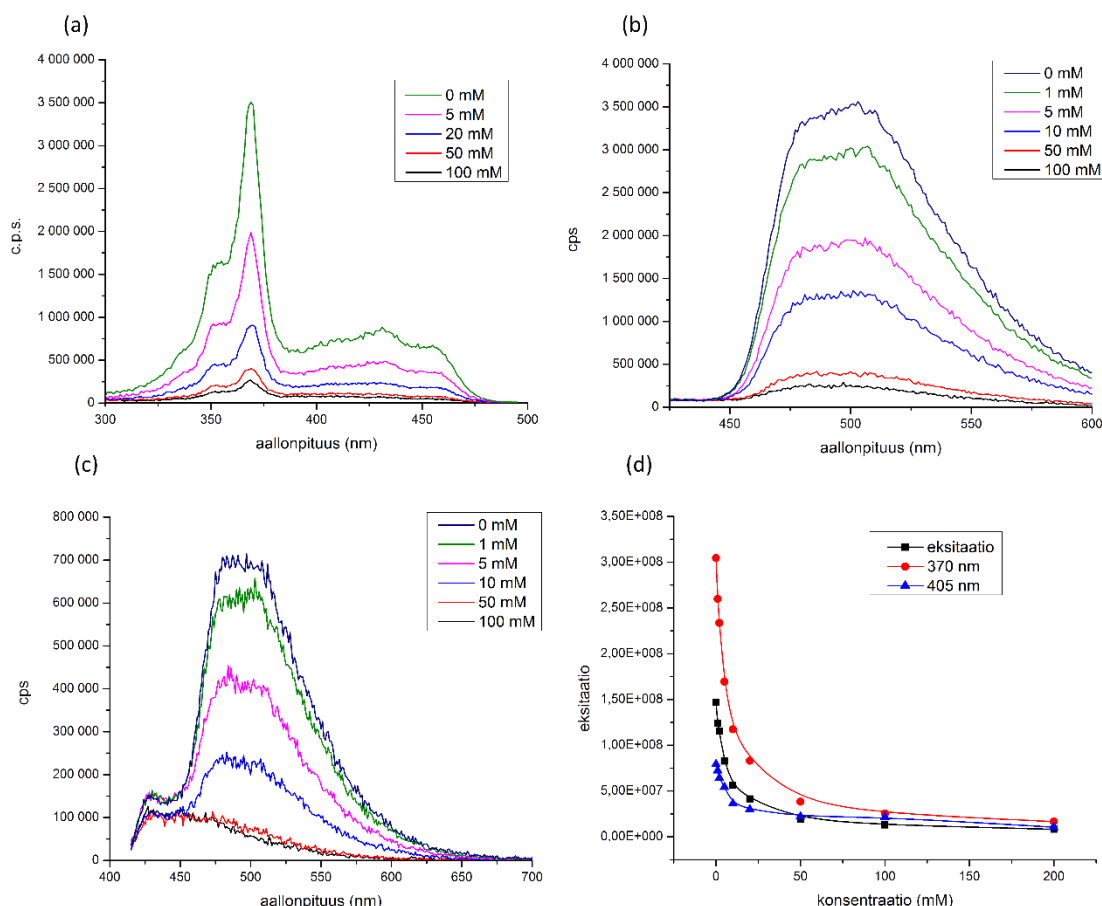
23 (d). nähdään instrumenttifunktio (IRF) ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat kolmella eri kalsiumkonsentraatiolla. Nähdään että vaimeneminen on yksiekspontiaalista, ja että konsentraation muutoksella ei ole vaikutusta fluoresenssin elinaikaan. Tarkemmat elinajat virheineen löytyvät liitteestä A.

4.3 Fluoresenssin riippuvuus kloridi-ionien konsentraatiosta

Kloridi-ionikonsentraatioon reagoivana merkkiaineena tutkittiin lusigeniinia. Toisin kuin aiemmillä merkkiaineilla, kloridi-ionit sammuttavat lusigeniinin fluoresenssia, eli se fluoresoi sitä heikommin mitä korkeampi kloridikonsentraatio on. Kuvassa 24 esitetään lusigeniinin absorptiospektrit. Voidaan havaita, että sen paremmin absorptiospektrin muoto kuin sen intensiteettikään ei muutu, vaikka kloridi-ionien konsentraatio kymmenkertaistuu. Cl^- -ionin sitoutuminen ei siis vaikuta perustilaan vaan ainoastaan virittyneeseen tilaan.



Kuva 24. Lusigeniinin absorbanssi kloridi-ionikonsentraatioilla 20 mmol/l ja 200 mmol/l. Lusigeniinin konsentraatio oli 0,25 $\mu\text{mol/l}$.

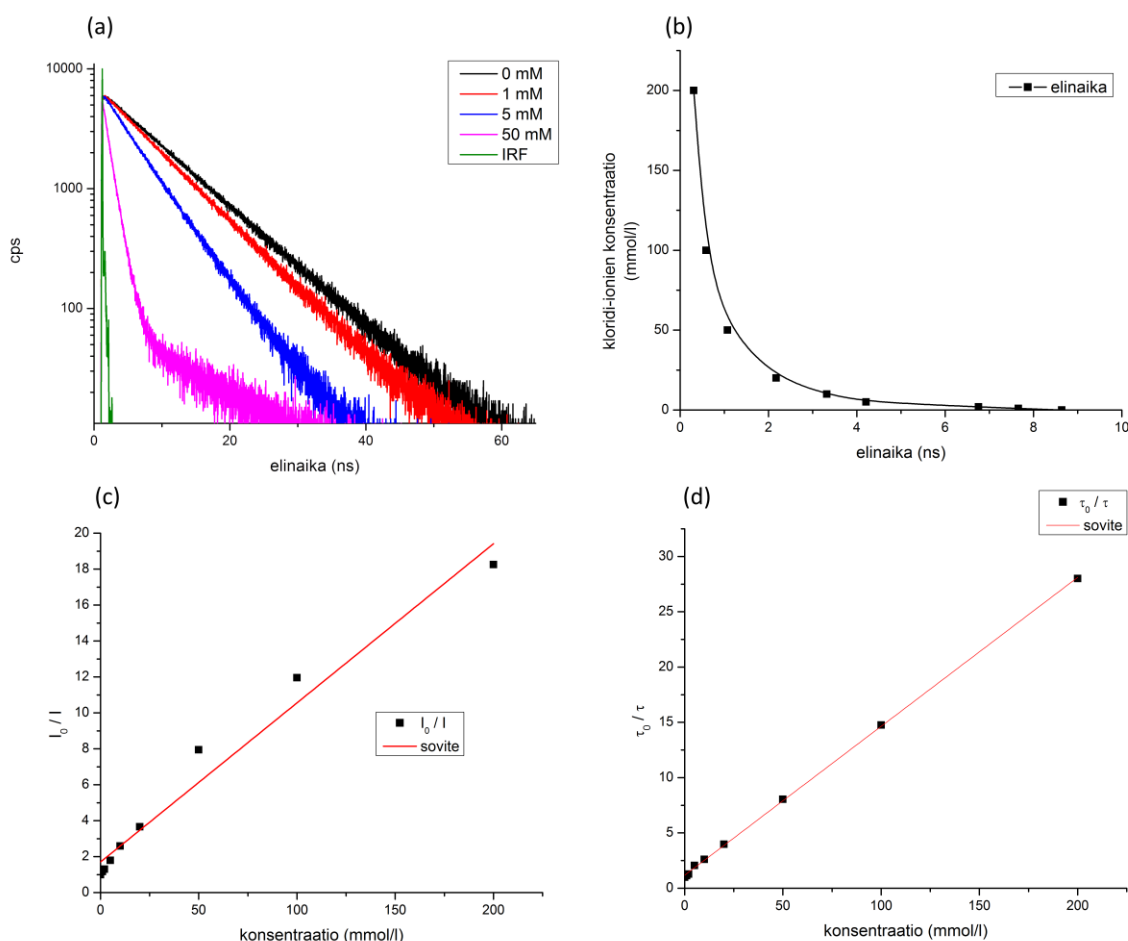


Kuva 25. *Lusigeniinin eksitaatiospektrit 505 nm monitorointiaallonpituudella (a), emissiospektrit 370 nm viritysaallonpituudella (b), emissiospektrit 405 nm viritysaallonpituudella (c), sekä eksitaation ja emission kokonaisintensiteetit esitetynä pinta-aloina (d). Lusigeniinin konsentraatio näytteissä' oli 0,25 $\mu\text{mol/l}$.*

Kuvassa 25. on kootusti esitettyä fluoresenssimittausten tulokset lusigeniinille. Näytteen eksitaatiospektri, kuva 25 (a), on muodoltaan pääpiirteissään samanlainen kuin kuvassa 24. esitetty absorptiospektri. Siinä on olkapää noin 350 nm, ja huippu 370 nm, kohdalla. Eksitaatiospektri ei muuta oleellisesti muotoaan, mutta sen intensiteetti heikkenee nopeasti kloridi-ionien konsentraation kasvaessa.

Kuvissa 25 (b) ja (c) on esitetty lusigeniinin fluoresenssispektrit 370 nm ja 405 nm viritysaallonpituuksilla. Ensimmäinen viritysaallonpituus osuu juuri eksitaatiospektrin huipun kohdalle, ja fluoresenssispektri on voimakas. Jälkimmäinen viritysaallonpituus valittiin solumittauksien tarpeita silmällä pitäen. Fluoresenssispektri on huomattavasti heikompi kuin ensimmäisellä kerralla, 0 mmol/l Cl^- -konsentraatiolla noin yksi viidesosa aiemmasta. Sen mittaamisessa ei kuitenkaan ollut ongelmia, ja eri kloridi-ionikonsentraatioiden vaikutukset erottuvat hyvin. Kummassakaan tapauksessa fluoresenssispektrin muoto ei oleellisesti muutu konsentraation muuttuessa.

Kuvassa 25 (d) esitetään lusigeniinin eksitaatio- ja emissiospektrien pinta-alat eri kloridi-ionikonsentraatioilla. Havaitaan spektrien kokonaisintensiteettien pienenevän hyvin nopeasti, kun kloridi-ionien konsentraatio kasvaa.

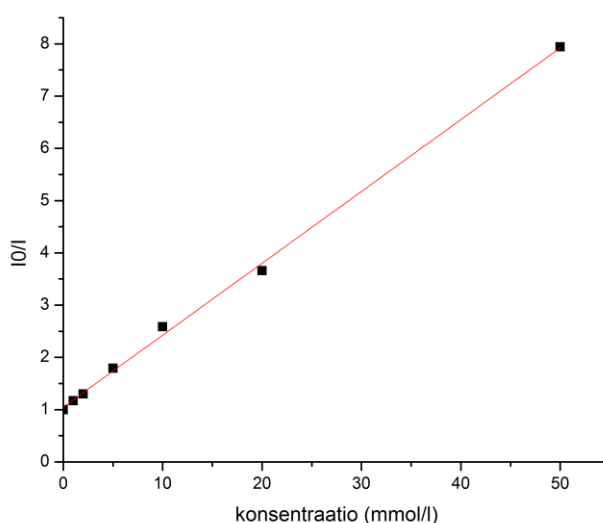


Kuva 26. *Lusigeniinin fluoresenssin vaimenemiskuvaajat eri kloridi-ionikonsentraatioilla (a) ja elinaika kloridi-ionien konsentraation muuttuessa (b), sekä Stern-Volmer –kuvaajat lusigeniinille intensiteetin (c) ja elinajan (d) osalta suhteessa kloridi-ionien konsentraatioon. Elinaikamittauksissa viritysaallonpituus oli 375 nm ja monitorointiaallonpituus 505 nm. Lusigeniinin konsentraatio näytteissä oli 0,25 $\mu\text{mol/l}$.*

Lusigeniinin elinaikamittauksissa käytettiin 375 nm viritysaallonpituutta, joka osuu hyvin lähelle eksitaatiospektrin voimakkainta huippua. Kuvassa 26 (a) nähdään fluoresenssin vaimeneminen neljällä eri kloridikonsentraatiolla sekä instrumenttifunktio (IRF). Matallilla kloridipitoisuuksilla vaimeneminen on yksiulotteista, mutta konsentraation kasvaessa se muuttuu 2-eksponentiaaliseksi (esim. 50 mM kuvaaja). Tuloksissa on keskitytty ensimmäiseen elinaikaan (1-eksponentiaalinen osuus), joka muuttuu selvästi Cl^- konsentraation mukaan, toisin kuin toinen elinaikakomponentti. Kuvassa 26 (b) on esitetty lusigeniinin fluoresenssin elinajan ja kloridi-ionien konsentraation suhde. Havaittiin, että

elinaika lyhenee erittäin voimakkaasti jo pienillä kloridi-ionikonsentraation muutoksilla. Fluoresenssin elinajat virheineen löytyvät taulukoituina liitteestä A.

Yllä kuvassa 25. on esitetty myös Stern-Volmer –suhde lusigeniinille sekä intensiteettien I_0/I (c) että elinaikojen τ_0/τ (d) osalta. Intensiteetin osalta kyseessä ei ole aivan täydellinen lineaarisuus, kuten dynaamisen sammumisen ideaalilanteessa pitäisi olla, vaan kuvaajasta tulee kupera. Jos kuitenkin tarkastellaan intensiteettien suhteita matalammilla kloridi-ionikonsentraatioilla ($[Cl^-] \leq 50$ mmol/l), kuten kuvassa 27. on tehty, ne kasvavat lineaarisesti. Voidaan olettaa, että suuremmilla kloridi-ionikonsentraatioilla mukaan tulee intensiteettimittauksia häiritseviä tekijöitä.



Kuva 27. Stern-Volmer-kuvaaja lusigeniinin fluoresenssin intensiteetille matalammilla (≤ 50 mmol/l) kloridi-ionien konsentraatioilla.

Molemmissa tapauksissa tulokset kasvavat hyvin lineaarisesti, kuten yksinkertaisen dynaamisen sammutuksen osalta pitäisikin. Etenkin elinajat osuvat erittäin hyvin suoralle. Kuvaajista saadaan kulmakertoimeksi intensiteeteille $K_{SVI} = 137,46 \pm 0,002$ M⁻¹ ja elinajoille $K_{SV\tau} = 134,65 \pm 0,0009$ M⁻¹. Nämä täsmäyvät hyvin toisiinsa. Kulmakertoimen pohjalta saadaan laskettua laskettua yhtälöä 2.16 käyttäen seuraavat, taulukossa 8. esitettävät arvot kloridi-ionien sammutuskertoimelle k_q lusigeniinin kanssa.

Taulukko 8. Kloridi-ionien sammutuskertoimen k_q arvot lusigeniinille, laskettuna intensiteetin ja elinajan perusteella

Tarkastelusuure	Sammutuskerroin k_q (M ⁻¹ s ⁻¹)
I_0/I	$15,91 \times 10^{-9}$
τ_0/τ	$15,59 \times 10^{-9}$

5. YHTEENVETO

Työssä pyrittiin karakterisoimaan neljän eri solumittauksiin sopivan kemosensoirin ominaisuuksia. Ensisijaisesti haluttiin saada tietoa niiden elinajan muutoksista ympäristön olosuhteiden muuttuessa, ja siitä voitaisiinko elinaikamittauksia käyttää olosuhteiden määrittämiseen. Toissijaisesti haluttiin myös tietoa tutkittavien molekyylien fluoresenssin intensiteetin ja spektrin muodon muutoksista, ja voitaisiinko kyseisiä muutoksia käyttää hyväksi stationäärisissä mittauksissa. Pyrittiin tavoitteisiin päästiin kaikkien neljän tutkittavana olleen molekyylin osalta. Seuraavaksi esitetään yhteenveto fluoresenssimittausten tuloksista ja niiden merkityksestä.

Ensimmäinen merkkiaine, jonka fluoresenssi oli pH-riippuvaa, oli BCECF. Se on karboksifluoreseiinin johdannainen ja tarkoitettu käytettäväksi pH 7,0:n molemmiin puoliin, esimerkiksi useimpien solujen sytosolissa; sen pK_a on 6,98 (Johnson & Spence 2010 s. 887). pH:n kasvaessa BCECF:n fluoresenssin elin aika pitenee, ja muutos on selvintä sekä lähes lineaarista välillä pH 5,8 – 7,4. Tällä alueella TCSPC:n erottelukyky on helposti 0,2 pH-yksikköä, mikä tekee BCECF:stä erittäin käyttökelpoisen pH-merkkiaineen solunsisäisissä olosuhteissa tapahtuvissa elinaikamittauksissa. BCECF:n happo- ja emäsmuotojen välisen tasapainon muutos näkyy suoraan sen absorptiospektrissä, mikä kertoo jo itsessään paljon näytteen pH:sta. Fluoresenssi- ja eksitaatiospektrien pohjalta BCECF:n erottelukyky on n. 1,0 pH –yksikköä, mikä kelpaa karkeampiin tarkoituksiin.

Seuraavaksi tutkittiin LysoSensor Bluen pH-riippuvaa fluoresenssia. Kuten aineen kaupanimestä voidaan huomata, se on tarkoitettu solunsisäisten happamien soluelinten kuten lysosomien kuvantamiseen. LysoSensor Bluen pK_a on ~5,1 (Johnson & Spence 2010, s. 895) joten sen fluoresenssi on erittäin heikkoa neutraaleissa oloissa. Elinaikamittauksissa todettiin, ettei fluoresenssin elin aika muutu merkittävästi välillä pH 3,0 – 6,0. Näin ollen LysoSensor Blue on sopimaton fluoresenssin elin aikaan perustuvissa mittauksissa. Sen fluoresenssin intensiteetti kuitenkin muuttuu voimakkaasti välillä pH 4,0 – 6,0, mikä tekee LysoSensor Bluesta käyttökelpoisen merkkiaineen stationäärisillä mittauksilla pH:n määrittämiseen ja vertailuun happamissa oloissa.

Kalsiumionien konsentraation vaikutusta fluoresenssiin tutkittiin Fluo-3:lla. TCSPC-mittauksissa todettiin, että kalsiumkonsentraatiolla ei ole vaikutusta Fluo-3:n fluoresenssin elin aikaan, eli merkkiaine on siinä mielessä hyödytön. Sen eksitaatio- ja emissiospektrien intensiteetti kuitenkin voimistuu selvästi kalsiumkonsentraation kasvaessa, joten Fluo-3 on käyttökelpoinen kalsiumpitoisuuden määrittämiseen stationaaritilassa. On kuitenkin otettava huomioon tasapainopiste n. 0,7 mM kalsiumkonsentraatiossa, joka sotkee muuten lineaarisen riippuvuuden.

Viimeisenä tutkittavana merkkiaineena oli lusigeniini, jonka fluoresenssia kloridi-ionit sammuttavat. TCSPC-mittauksissa todettiin jo hyvin pienen kloridi-ionikonsentraation kasvun lyhentävän fluoresenssin elinaikaa voimakkaasti: välillä 0 – 5 mM elinajan muutos on luokkaa 1 ns per 1 mM. Solumittauksia ajatellen tiedetään sytosolin Cl⁻-konsentraation olevan nisäkkäiden soluissa luokkaa 4 mmol/l, kun taas veren Cl⁻ konsentraatio on normaalisti välillä 98-106 mmol/l (Wallach 2007). Tämän perusteella lusigeniini sopii hyvin solunsisäisen kloridipitoisuuden määrittämiseen, sekä elinaikaan että fluoresenssin intensiteettiin pohjautuvilla menetelmillä, mutta kudospitoisuuden ja veren kloridipitoisuus on sille liian korkea.

Yleisesti ottaen työssä saatiin hyödyllistä tietoa tutkittavien fluoroforien ominaisuuksista, ja todettiin BCECF:n ja lusigeniinin soveltuvan hyvin käytettäväksi fluoresenssin elinaikamittauksiin solujen pH:n ja kloridi-ionikonsentraation määrittämiseksi. Tuloksia voidaan toivottavasti soveltaa suoraan tulevissa solumittauksissa.

Koska LysoSensor Blue DND-167:n ja Fluo-3:n osoittautuivat sopimattomiksi elinaikamittauksia ajatellen, voisi olla hyödyllistä tutkia toisten LysoSensor- ja Fluo-merkkiaineiden elinajan mahdollista herkkyyttä pH:n ja kalsiumpitoisuuden muutoksille. Fluo-4 ja LysoSensor Green DND-189 vaikuttavat tässä mielessä lupaavimmilta, sillä ne ovat ominaisuuksiltaan lähinnä tässä tutkittuja merkkiaineita. (Johnson & Spence 2019, s.843-844, 898-899)

LÄHTEET

Arkin M.R., Glicksman M.A., Fu H., Havel J.J. and Du Y. (2012) Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Biwersi J., Tulk B., Verkman A.S. (1994) Long-Wavelength Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators. *Analytical Biochemistry* Vol. 219, 139-143.

Boens N., Wenwu Q., Basarić N., Orte A., Talavera E.M., Alvarez-Pez J.M. (2006) Photophysics of the Fluorescent pH Indicator BCECF, *J. Phys. Chem. A* 2006 110, 9334-9343

Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.-J., Wiemann M. (2018) Aging is associated with mild acidification in neocortical human neurons in vitro. *Journal of Neural Transmission* (2018) 125:1495–1501

Broudy V.C., Lin N.L., Bühring H.-J., Komatsu N, and Kavanagh T.J. (1998) Analysis of *c-kit* Receptor Dimerization by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Blood* 1998 91: 898-906.

Engel T. & Reid P. (2010) Physical Chemistry, Pearson Education. 2nd edition.

Ferdani R., Li R., Pajewski R., Pajewska J., Winter R.K., Gokel G.W. (2007) Transport of chloride and carboxyfluorescein through phospholipid vesicle membranes by heptapeptide amphiphiles. *Org Biomol Chem.* 2007 August 7; 5(15): 2423–2432.

Giusti C., Luciani M.-F., Klein G., Aubry L., Tresse E., Kosta A., Golstein P. (2009) Necrotic cell death: From reversible mitochondrial uncoupling to irreversible lysosomal permeabilization. *Experimental Cell Research* 315 26-38.

Gonçalves, Christopher M. & Mulkey, Daniel K. (2018) Bicarbonate directly modulates activity of chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol* 596.17 (2018) pp 4033–4042

Graefe A., Stanca S.E., Nietzsche S., Kubicova L, Beckert R., Biskup C., Mohr G.J. (2008) Development and Critical Evaluation of Fluorescent Chloride Nanosensors. *Anal. Chem.*, 2008, 80 (17), pp 6526–6531

Han J. and Burgess K. (2010) Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chem. Rev.*, 2010, 110 (5), pp 2709–2728

Heumüller S., Wind S., Barbosa-Sicard E., Schmidt H.H.H.W., Busse R., Schröder K., Branders R.P. (2008) Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. *Hypertension* 2008; 51:211-217

Hille C., Berg M., Bressel L., Munzke D., Primus P., Löhmannsröben H.-G., Dosche C. (2008) Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues. *Anal Bioanal Chem* (2008) 391:1871-1879.

HORIBA Instruments Incorporated (2014). Fluorolog-3 with FluorEssence operation manual, Jobin Yvon Technology, HORIBA Scientific.

Huber C., Krause C., Werner T., Wolfbeis O.S. (2003) Serum Chloride Optical Sensors Based on Dynamic Quenching of the Fluorescence of Photo-Immobilized Lucigenin. *Microchim. Acta* 142, 245-253.

Johnson I. (editor), Spence M.T.Z. (editor) (2010). Molecular Probes Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, ThermoFisher Scientific. 11th edition.

Kalliorinne K., Kankaanperä A., Kivinen A., Liukkonen S. (1990), Fysikaalinen kemia 3: Dynamiikka, Kirjayhtymä.

Kao J.P.Y., Harootunian A.T., Tsien R.Y. (1989) Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3. *J Biol Chem* (1989) 264:8179

Lakowicz J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer. 3rd edition.

Legg K.D. and Hercules D.M. (1970) Quenching of Lucigenin Fluorescence. *J. Phys. Chem.* 1970, 74, 2114-2118.

Lin H.-J., Herman P., Kang J.S., Lakowicz J.R. (2001) Fluorescence Lifetime Characterization of Novel Low-pH Probes. *Analytical Biochemistry* 294, 118-125.

Martínez R.A., Isari S., Calbet A. (2014) Use of live, fluorescently-labeled algae for measuring microzooplankton grazing in natural communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 457 59–70

McNally B.A., Koulov A.V., Lambert T.N, Smith B.D., Joos J-B., Sisson A.L., Clare J.P., Sgarlata V., Judd L.W., Magro G., Davis A.P. (2008) Structure–Activity Relationships in Cholapod Anion Carriers: Enhanced Transmembrane Chloride Transport through Substituent Tuning. *Chemistry*. 2008; 14(31): 9599–9606.

McQueen P.D., Sagoo S., Yao H. and Jockush R.A. (2010) On the Intrinsic Photophysics of Fluorescein. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9193 – 9196.

Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. (1989) Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores. *J Biol Chem* (1989) 264:8171

- Mohd-Zamri N.H., Mat-Desa N.W., Abu-Bakar N. (2017) Sensitivity of artemisinin towards different stages of development of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Tropical Biomedicine* 34(4): 759-769.
- Oswald G., Alzoubi K., Abed M., Lang F. (2014) Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Ribavirin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2014, 114, 311–317
- Ruedas-Rama MJ, Orte A., Hall E.A.H., Alvarez-Pez J.M., Talavera E.M. (2012) A chloride ion nanosensor for time-resolved fluorimetry and fluorescence lifetime imaging. *Analyst*, 2012, **137**, 1500-1508
- Seufferheld M., Vieira M.C.F., Ruiz F.A., Rodrigues C.O., Moreno S.N.J., Docampo R. Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:29971-29978.
- Sjöback R., Nygren J., Kubista M. (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A* 5, 1995, pp. L7—L21.
- Souza-Silva L., Alves-Lopes R., Miguez J.S., Dela Justina V., Neves K.B., Mestriner F.L., Tostes R.D., Gianchini F.R., Lima V.V. (2018) Glycosylation with O-linked beta-N-acetylglucosamine induces vascular dysfunction via production of superoxide anion/reactive oxygen species. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 96, issue 3.
- Stahlke S., Rebl H., Finke B., Mueller P., Gruening M., Nebe J.B. (2018) Enhanced calcium ion mobilization in osteoblasts on amino group containing plasma polymer nanolayer. *Cell Biosci* (2018) 8:22
- Tkachenko, Nikolai. V. (2006). Optical Spectroscopy Methods and Instrumentations, Elsevier. 1st edition.
- Tsai Y.-T., Lee C.-Y., Chuang C.-C., Lin H.-J., Wu C.-H., Yang Y.-Z., Tsai C.-S., and Loh S.-H. (2015) *Chinese Journal of Physiology* 58(4): 228-236
- Valeur, Bernard. (2001). Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH. 1st edition.
- Voigt N., Heijman J., Wang Q., Chiang D.Y., Li N., Karck M., Wehrens X.H.T., Nattel S., Dobrev D. (2014) Cellular and Molecular Mechanisms of Atrial Arrhythmogenesis in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2014; 129:145-156.
- Wallach, J. (2007) Interpretation of Diagnostic Tests, 8th edition. Wolters Kluwer, Philadelphia.

LIITE A: FLUORESENSSIN ELINAIKAMITTAUSTENTULOKSET

Taulukko A1. Fluoresenssin elinajat virheineen BCECF:lle

Näytteen pH	Elinaika (ns)	Elinajan virhe \pm (ns)
8,0	3,8356	0,0209
7,6	3,7928	0,0214
7,4	3,7889	0,0212
7,2	3,7095	0,0216
7,0	3,6287	0,0220
6,8	3,5621	0,0218
6,6	3,3824	0,0217
6,4	3,3503	0,0217
6,2	3,2353	0,0211
5,8	3,0782	0,0197
5,4	2,9985	0,0187
5,0	2,9687	0,0190

Taulukko A2. Fluoresenssin elinajat virheineen LysoSensor Blue

Näytteen pH	Elinaika (ns)	Elinajan virhe \pm (ns)
3,0	11,9066	0,0711
3,4	11,9019	0,0713
4,0	11,8717	0,0716
4,4	11,9013	0,0718
4,8	11,8428	0,0732
5,2	11,7717	0,0730
5,6	11,7155	0,0734
6,0	11,6098	0,0781
6,6	11,3246	0,1344
7,4	9,8316	0,7891

Taulukko A3. Fluoresenssin elinajat virheineen Fluo-3:lle

Ca ²⁺ -konsentraatio (μ mol/l)	Elinaika (ns)	Elinajan virhe \pm (ns)
5,0	0,3873	0,0461
2,8	0,1877	0,0316
1,4	0,2046	0,0315
0,70	0,1851	0,0329
0,35	0,1961	0,0320
0,25	0,4011	0,0411

Taulukko A4. Fluoresenssin elinajat virheineen lusigeniinille

Cl⁻ konsentraatio (mmol/l)	Elin aika (ns)	Elin ajan virhe ± (ns)
0,0	8,63884	0.0611727
1,0	7,6561	0.0590094
2,0	6,75367	0.057744
5,0	4,21097	0.197093
10	3,31923	0.052481
20	2,17498	0.0386182
50	1,07271	0.0305863
100	0,585328	0.025287
200	0,308551	0.0190144